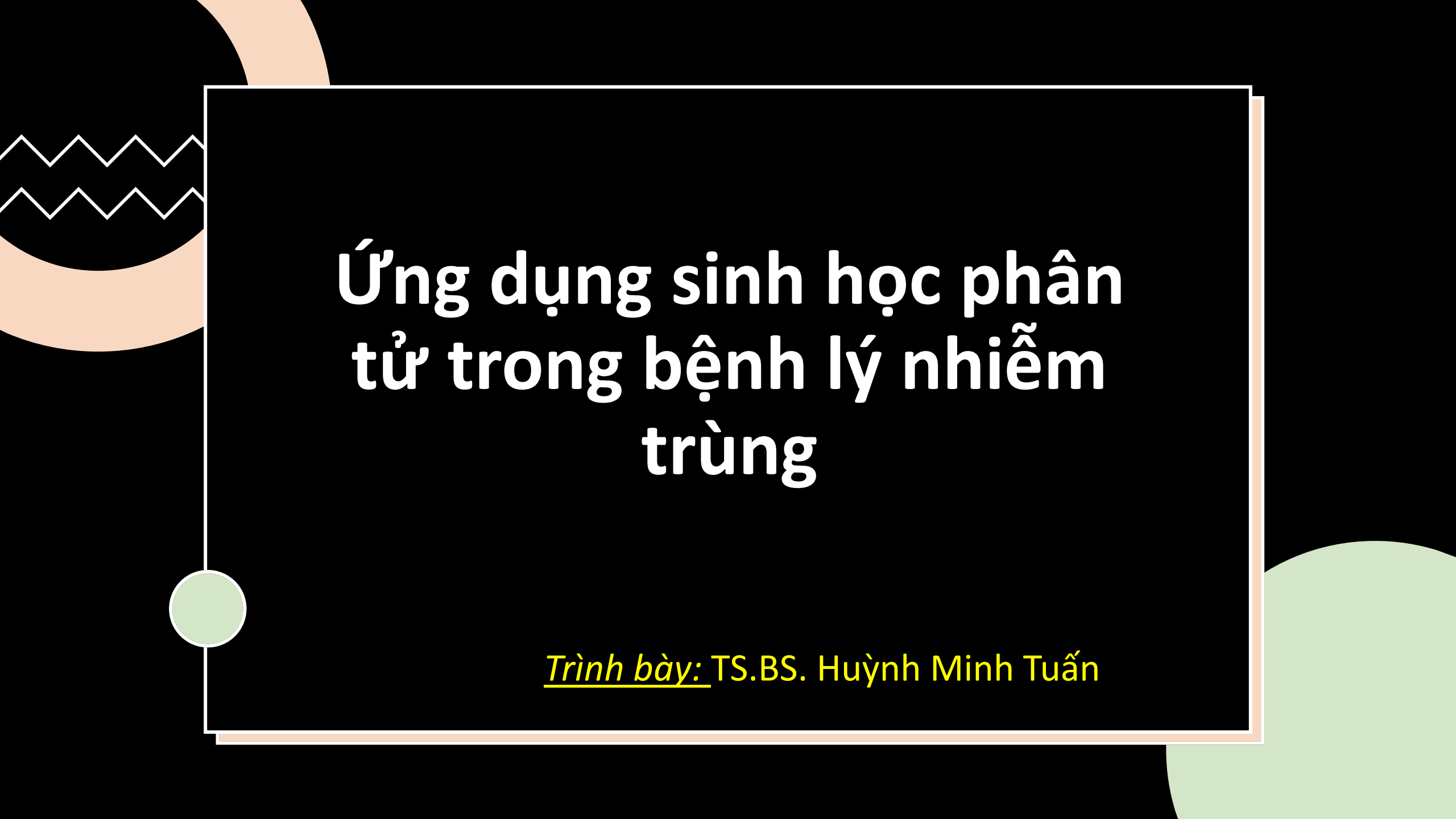




Ứng dụng sinh học phân tử trong bệnh lý nhiễm trùng

Trình bày: TS.BS. Huỳnh Minh Tuấn



Mục tiêu

- 1. Trình bày và giải thích các định nghĩa và thuật ngữ cơ bản**
- 2. Trình bày nguyên tắc, ưu – nhược điểm của một số ứng dụng kỹ thuật SHPT cơ bản trong chẩn đoán, xác định genotype, đột biến, giải trình tự một số tác nhân vi sinh vật gây bệnh**



Nội dung

- 1. Giới thiệu và giải thích một số định nghĩa và thuật ngữ cơ bản**
- 2. Một số kỹ thuật SHPT cơ bản ứng dụng trong chẩn đoán, xác định genotype, đột biến, giải trình tự gen tác nhân vi sinh vật**

Các hình thức xét nghiệm vi sinh phát hiện vi sinh vật gây bệnh

1. Khảo sát trực tiếp
2. Nuôi cấy – phân lập – kháng sinh đồ
3. Huyết thanh học
4. Miễn dịch
5. Sinh học phân tử

TRUYỀN THỐNG

CÔNG NGHỆ



Khảo sát trực tiếp

- Phát hiện tác nhân gây bệnh bằng cách khảo sát trực tiếp bệnh phẩm lâm sàng
 - Các phương pháp nhuộm
 - Kính hiển vi: quang học, huỳnh quang, điện tử



Nuôi cấy – Phân lập – Kháng sinh đồ

- Phân lập tác nhân gây bệnh bằng cách nuôi cấy trong môi trường (vi khuẩn) hoặc nuôi cấy trên tế bào/tiêm chích vào động vật thí nghiệm (vi-rút)
- **Kháng sinh đồ**



Huyết thanh học – Miễn dịch học

- Phát hiện kháng thể đặc hiệu của tác nhân gây bệnh lưu hành trong máu/huyết thanh của bệnh nhân
- Phát hiện kháng nguyên: kháng thể đơn dòng/đa dòng



Sinh học phân tử

- **Genomics**

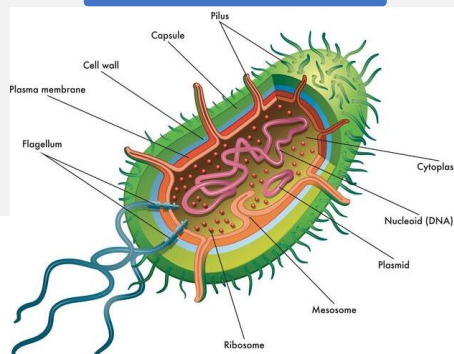
- Phát hiện nucleic acid đặc hiệu (ADN, ARN) của tác nhân gây bệnh trong bệnh phẩm lâm sàng

- **Proteomics**

- Khối phổ (Mass Spectrometry)

Proteomics vs Genomics

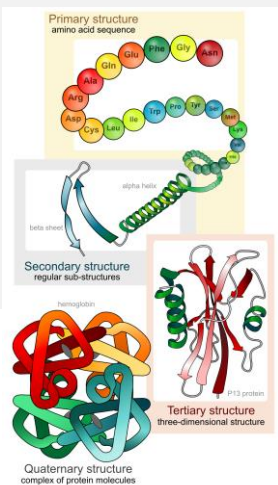
Vi khuẩn



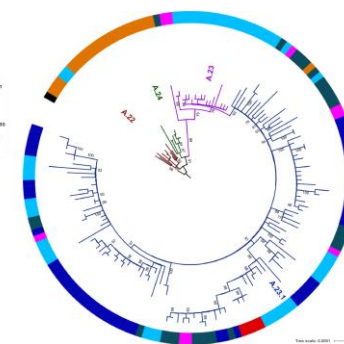
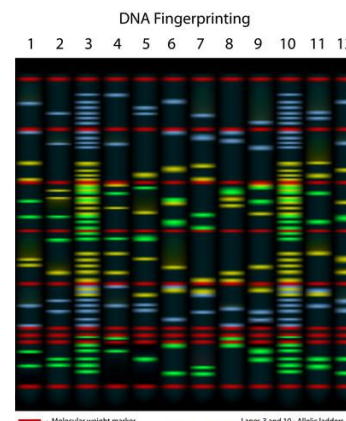
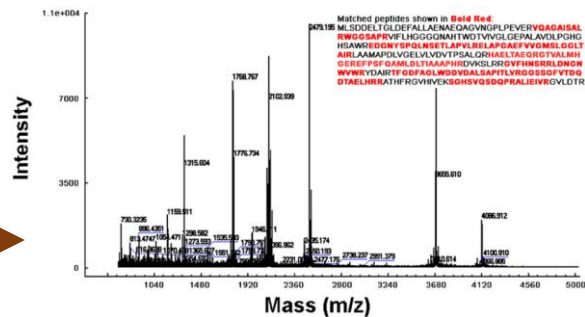
DNA



Protein



ĐỊNH DANH



Mass Fingerprint

DNA Fingerprint

Genome

Proteome

Ưu điểm của sinh học phân tử

1. Khả năng định danh rộng vs nhanh
2. Định lượng nồng độ (ví dụ: tải lượng vi-rút = viral load) trong mẫu bệnh phẩm giúp theo dõi diễn tiến điều trị
3. Xác định kiểu gen, giúp quyết định/định hướng phác đồ điều trị, đánh giá tiên lượng vs nguy cơ bệnh
4. Xác định kiểu đột biến (đặc biệt hữu ích trong đột biến kháng thuốc) giúp thay đổi phác đồ điều trị hiệu quả
5. Tái phát vs tái nhiễm
6. Nghiên cứu dịch tễ học phân tử các vi sinh vật gây bệnh giúp giám sát, kiểm soát nguồn lây trong các vụ dịch



Khả năng định danh **rộng** vs **nhanh**

1. Tác nhân VSV không nuôi cấy được hoặc rất khó/rất tốn kém (Chlamydia, HCV, HPV)
2. Tác nhân mọc chậm (Mycobacteria, Legionella)
3. Tác nhân nguy hiểm (cúm A/H5, SARS-CoV-2, Francisella tularensis, Brucella)
4. Tác nhân nuôi cấy thất bại (vì số lượng mẫu ít, đã Rx kháng sinh trước đó như lao, viêm màng não mủ cắt đầu, lậu cắt đầu)
5. Tác nhân hiện diện với số lượng thấp trong mẫu bệnh phẩm (HCV, HIV, CMV)
6. Khẳng định kết quả nuôi cấy

Các kỹ thuật phát hiện **vật chất di truyền**

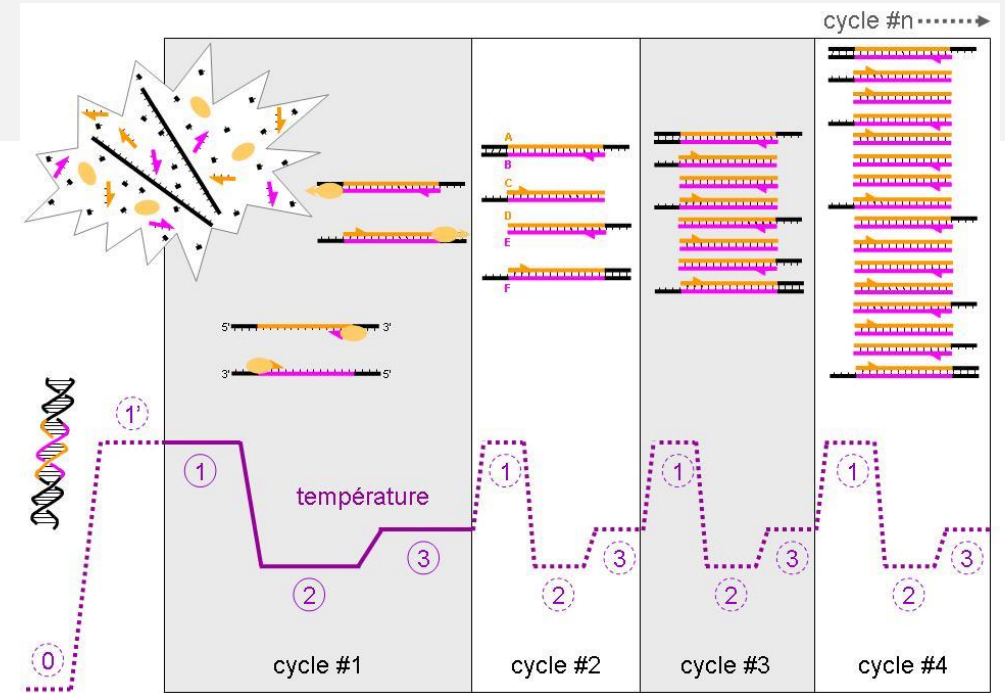
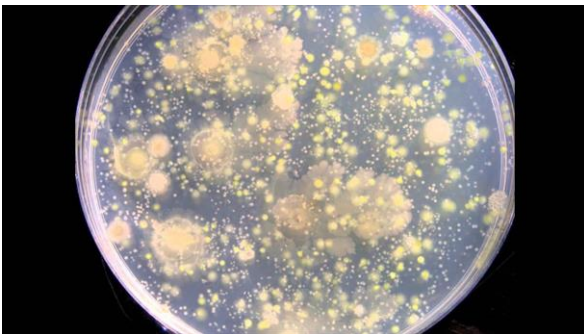
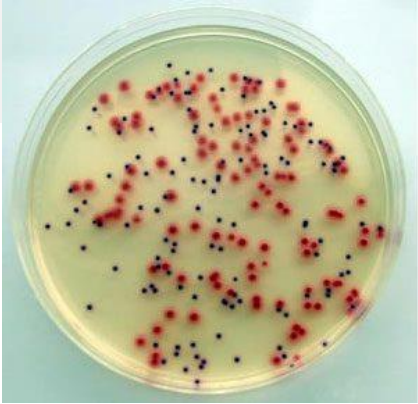
- **Phát hiện trực tiếp**: sử dụng các đoạn dò lai với DNA/RNA đích; VD: lai phân tử bằng các đoạn dò đánh dấu, FISH (Fluorescent in-situ Hybridization)...
- **Khuếch đại nucleic acid**
 - Khuếch đại các đoạn dò: LCR (Ligase Chain Reaction)
 - Khuếch đại tín hiệu: Branched DNA technology
 - Khuếch đại DNA/RNA đích
 - Chu kỳ nhiệt: **PCR (Polymerease Chain Reaction)** cho DNA, RT-PCR cho RNA, real-time PCR (PCR định lượng)
 - Đẳng nhiệt: TMA (Transcription mediated amplification), NASBA nhân bản RNA/DNA
- **Giải trình tự**



Một số kỹ thuật phát hiện trực tiếp

- Lai phân tử
- Southern Blot/Northern Blot
- FISH

Kỹ thuật khuếch đại đoạn nucleic acid đích



- Kích thước đoạn gen
- Trình tự đặc hiệu của đoạn gen

Nguồn: Internet

PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Phương pháp (xét nghiệm) PCR (sinh học phân tử) là một kỹ thuật nhằm tạo ra số lượng lớn bản sao DNA **đích** trong ống nghiệm từ **một** khuôn mẫu DNA trong bệnh phẩm dựa vào chu kỳ nhiệt
- Kary Mullis (người Mỹ) phát minh vào năm 1985

..the idea of PCR came to him
while driving with his girlfriend
on a highway..

"It was quiet and something
just went, Click!"

KARY B MULLIS

1944 - 2019

Inventor of PCR Technique



Nguồn: Internet

Công bố đầu tiên (1985) & Nobel Prize (1993)

RESEARCH ARTICLE

Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis
Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

Recent advances in recombinant DNA technology have made possible the molecular analysis and prenatal diagnosis of several human genetic diseases. Fetal DNA obtained by amniocentesis or chorionic villus sampling can be analyzed by restriction enzyme digestion, with subsequent electrophoresis, Southern transfer, and specific hybridization to cloned gene or oligonucleotide probes. With

This disease results from homozygosity of the sickle-cell allele (β^S) at the β -globin gene locus. The S allele differs from the wild-type allele (β^A) by substitution of an A in the wild-type to a T at the second position of the sixth codon of the β chain gene, resulting in the replacement of a glutamic acid by a valine in the expressed protein. For the prenatal diagnosis of sickle cell anemia, DNA ob-

Abstract. Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific β -globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the β^A and β^S alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified β -globin sequences. The β -globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.

polymorphic DNA markers linked genetically to a specific disease locus, segregation analysis must be carried out with restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) found to be informative by examining DNA from family members (1, 2).

Many of the hemoglobinopathies, however, can be detected by more direct methods in which analysis of the fetus alone is sufficient for diagnosis. For example, the diagnosis of hydrops fetalis (homozygous α -thalassemia) can be made by documenting the absence of any α -globin genes by hybridization with an α -globin probe (3-5). Homozygosity for certain β -thalassemia alleles can be determined in Southern transfer experiments by using oligonucleotide probes that form stable duplexes with the normal β -globin gene sequence but form unstable hybrids with specific mutants (6, 7).

Sickle cell anemia can also be diagnosed by direct analysis of fetal DNA.

1350

tained by amniocentesis or chorionic villus sampling can be treated with a restriction endonuclease (for example, Dde I and Mst II) that recognizes a sequence altered by the β^S mutation (8-11). This generates β^A - and β^S -specific restriction fragments that can be resolved by Southern transfer and hybridization with a β -globin probe.

We have developed a procedure for the detection of the sickle cell mutation that is very rapid and is at least two orders of magnitude more sensitive than standard Southern blotting. There are two special features to this protocol. The first is a method for amplifying specific β -globin DNA sequences with the use of oligonucleotide primers and DNA polymerase (12). The second is the analysis of the β -globin genotype by solution hybridization of the amplified DNA with a specific oligonucleotide probe and subsequent digestion with a restriction endonuclease (13). These two techniques increase the speed and sensitivity, and

lessen the complexity of prenatal diagnosis for sickle cell anemia; they may also be generally applicable to the diagnosis of other genetic diseases and in the use of DNA probes for infectious disease diagnosis.

Sequence amplification by polymerase chain reaction. We use a two-step procedure for determining the β -globin genotype of human genomic DNA samples. First, a small portion of the β -globin gene sequence spanning the polymorphic Dde I restriction site diagnostic of the β^A allele is amplified. Next, the presence or absence of the Dde I restriction site in the amplified DNA sample is determined by solution hybridization with an end-labeled complementary oligomer followed by restriction endonuclease digestion, electrophoresis, and autoradiography.

The β -globin gene segment was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) procedure of Mullis and Faloona (12) in which we used two 20-base oligonucleotide primers that flank the region to be amplified. One primer, PC04, is complementary to the (+)-strand and the other, PC03, is complementary to the (-)-strand (Fig. 1). The annealing of PC04 to the (+)-strand of denatured genomic DNA followed by extension with the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I and deoxynucleotide triphosphates results in the synthesis of a (-)-strand fragment containing the target sequence. At the same time, a similar reaction occurs with PC03, creating a new (+)-strand. Since these newly synthesized DNA strands are themselves template for the PCR primers, repeated cycles of denaturation, primer annealing, and extension result in the exponential accumulation of the 110-base pair region defined by the primers.

An example of the degree of specific gene amplification achieved by the PCR method is shown in Fig. 2A. Samples of DNA (1 μ g) were amplified for 20 cycles and a fraction of each sample, equivalent to 36 ng of the original DNA, was subjected to alkaline gel electrophoresis and transferred to a nylon filter. The filter was then hybridized with a 32 P-labeled 40-base oligonucleotide probe, RS06, which is complementary to the target sequence (Fig. 1A) but not to the PCR primers. The results, after a 2-hour autoradiographic exposure, show that a fragment hybridizing with the RS06 probe

The authors are in the Department of Human Genetics, Cetus Corporation, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, California 94608. The present address for N.A. is Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles 90089-0371.

SCIENCE, VOL. 230

Downloaded from <http://science.sciencemag.org/> on January 28, 2019

THE NOBEL PRIZE

Nobel Prizes & Laureates

Nomination

Alfred Nobel

News & insights

Events

Education network

Chemistry

The Nobel Prize in Chemistry 1993

Kary B. Mullis - Facts

The Nobel Prize in Chemistry 1993

Kary B. Mullis
Michael Smith

Share this



Kary B. Mullis Facts



Photo from the Nobel Foundation archive.

Kary B. Mullis
The Nobel Prize in Chemistry 1993

Born: 28 December 1944, Lenoir, NC, USA

Died: 7 August 2019, Newport Beach, CA, USA

Affiliation at the time of the award: , La Jolla, CA, USA

Prize motivation: "for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method."

Prize share: 1/2

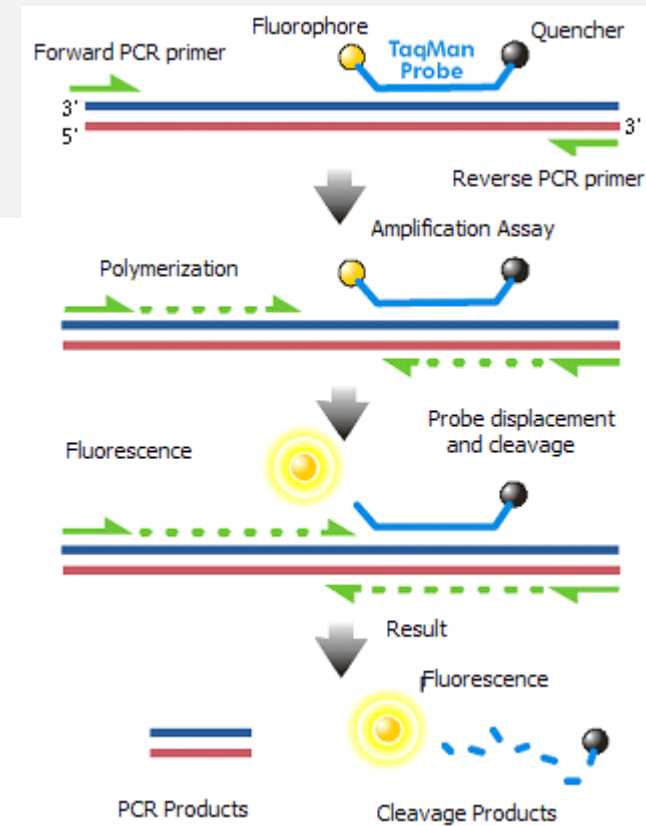
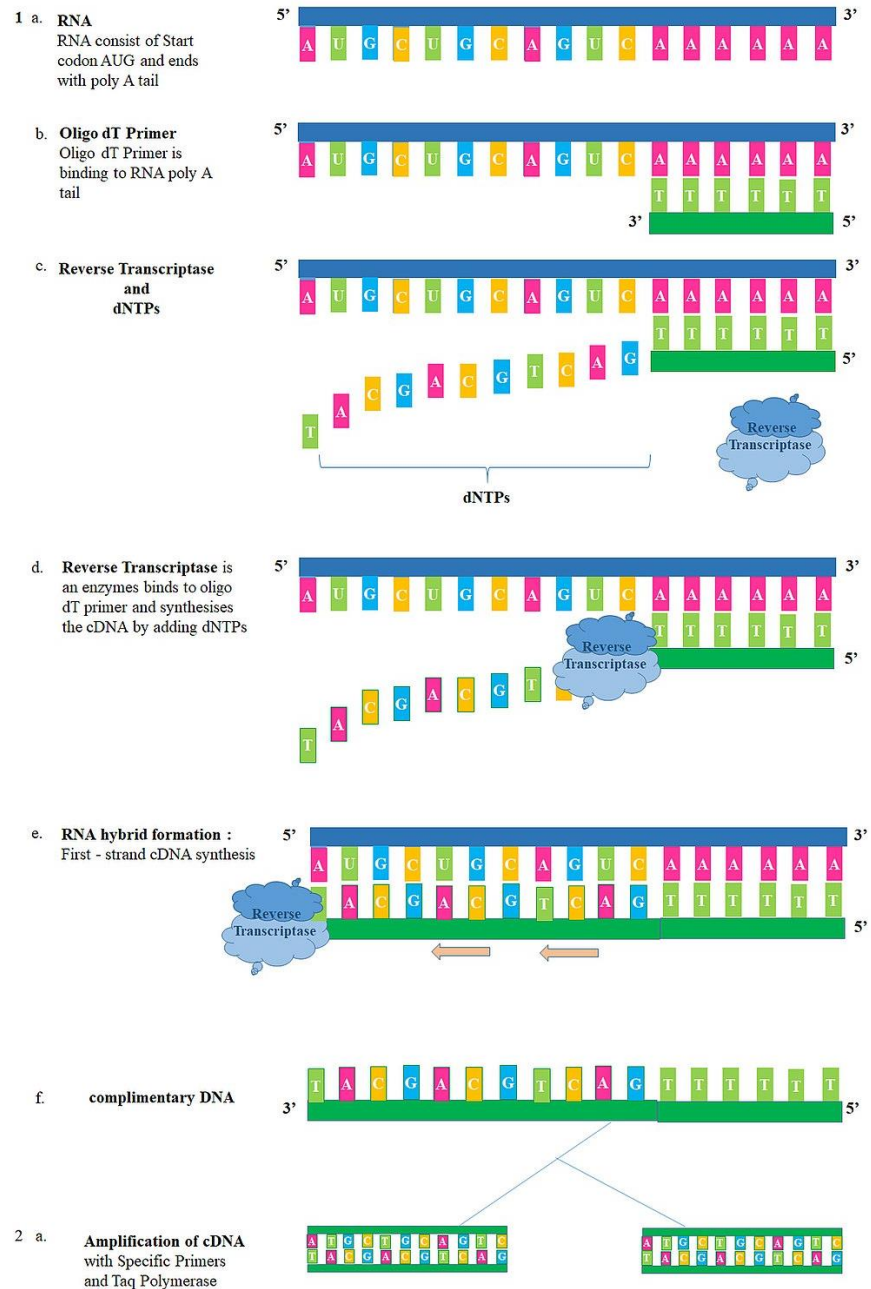
Nguồn: Internet



PCR hiện nay: **rất nhiều biến thể...**

- RT-PCR
- One-step RT-PCT
- Two-step RT-PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR, hemi-nested PCR
- Non-stop nested PCR
- Touch-down PCR
- ...

RT-PCR

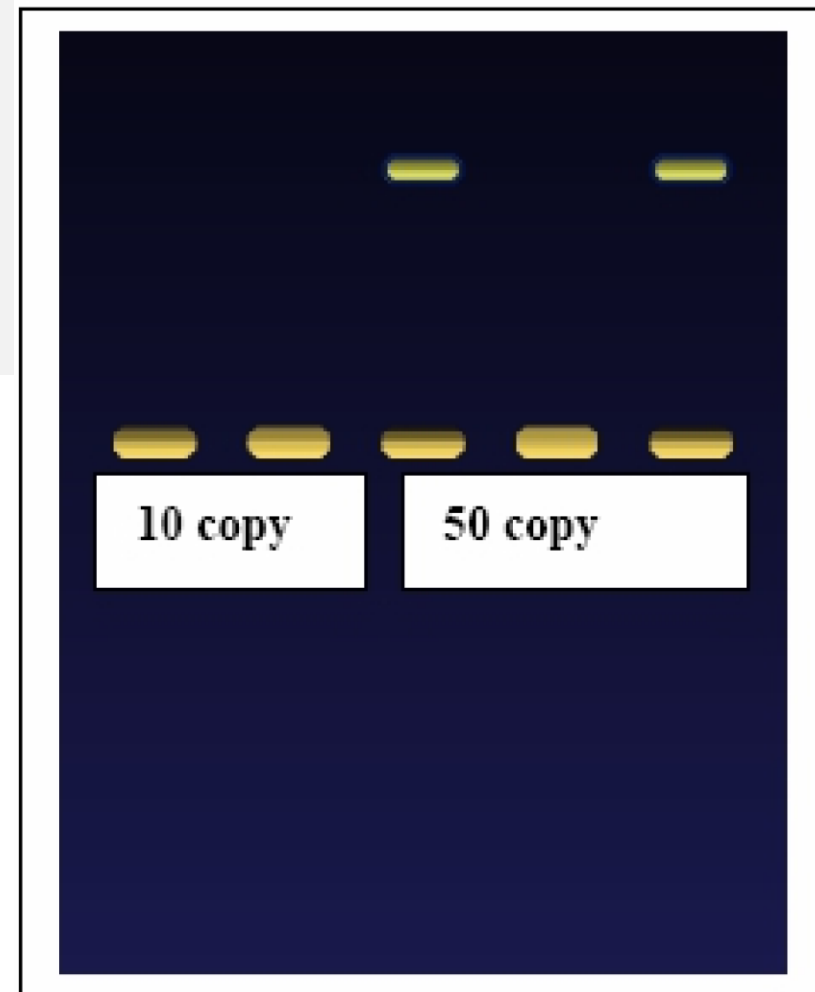


Nguồn: Internet

Giới hạn của PCR

- Phân biệt dựa vào kích thước sản phẩm PCR bằng kỹ thuật điện di trên agarose gel
- Khả năng ngoại nhiễm cao (vì phải xử lý hậu-PCR)
- Ethidium bromide trong điện di trên agarose gel là chất gây K
- Độ nhạy thấp
- Độ đặc hiệu kém

ĐỊNH TÍNH HOẶC BÁN ĐỊNH LƯỢNG

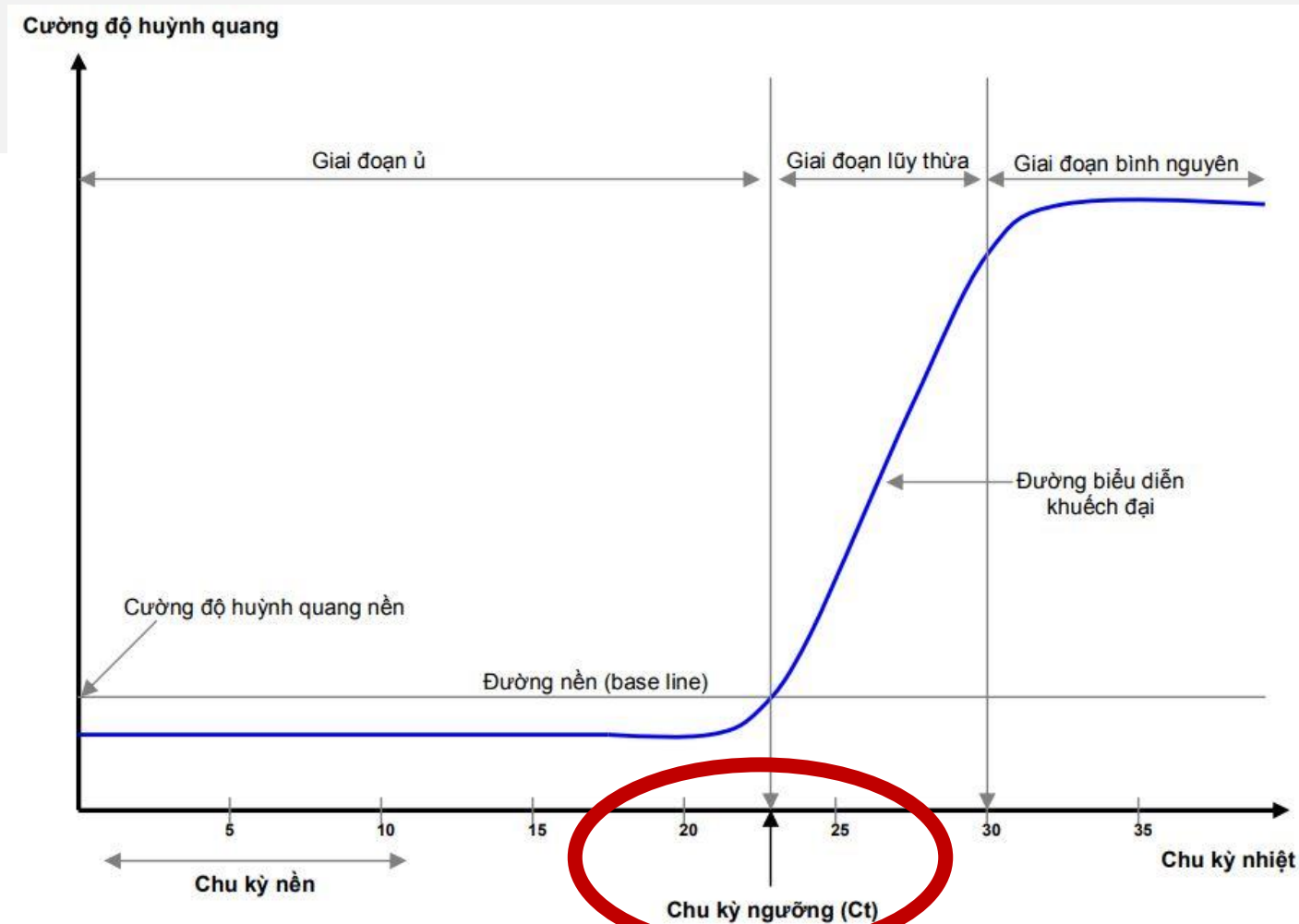




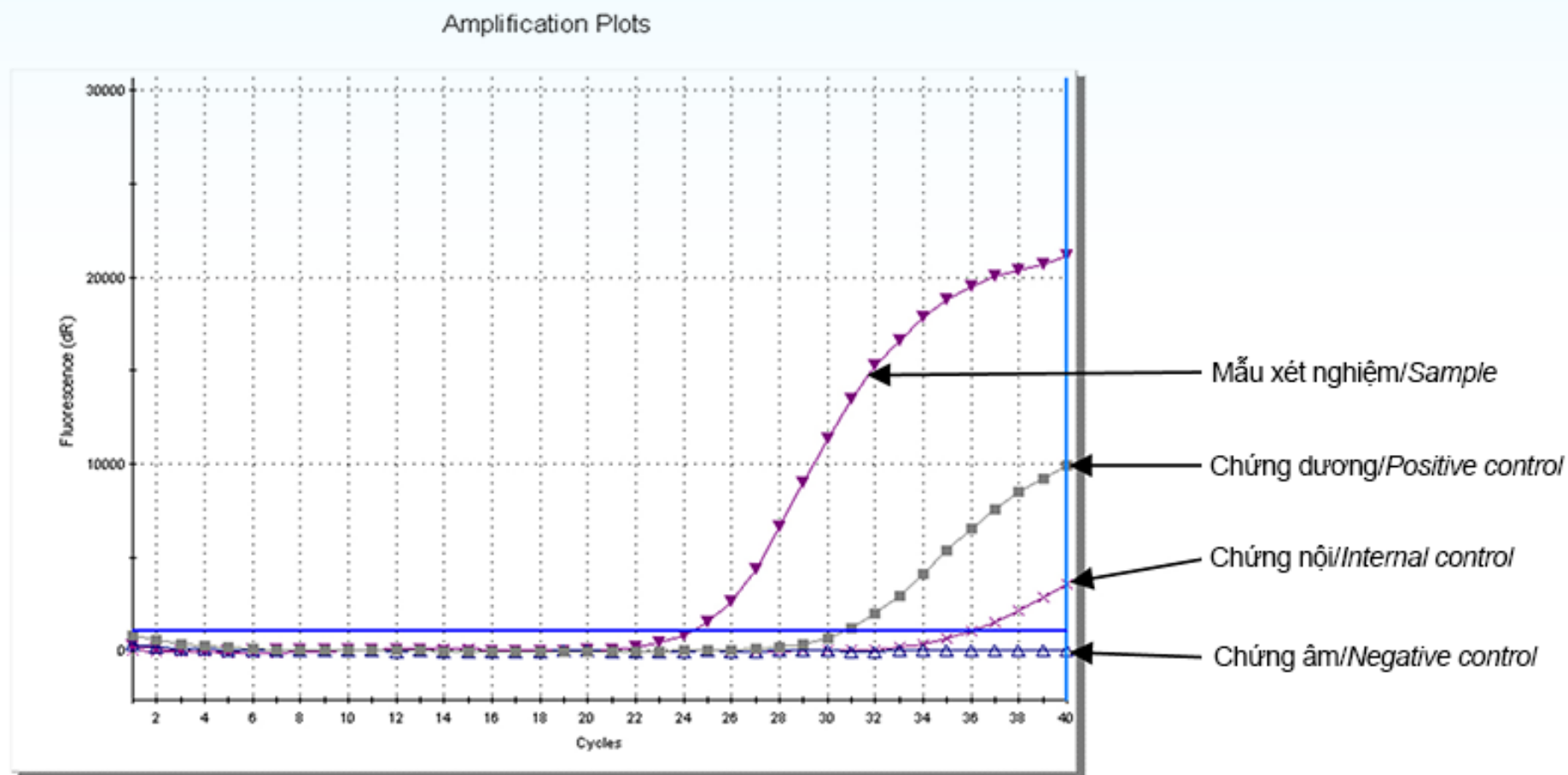
Real-time PCR

- Quá trình nhân bản DNA được theo dõi **trực tiếp** trên máy PCR theo từng chu kỳ nhiệt
- Kiểm soát tín hiệu huỳnh quang phát ra trong mỗi chu kỳ phản ứng; **tín hiệu huỳnh quang tỷ lệ thuận với lượng sản phẩm PCR tạo ra trong từng chu kỳ**

Biểu đồ khuếch đại tín hiệu real-time PCR

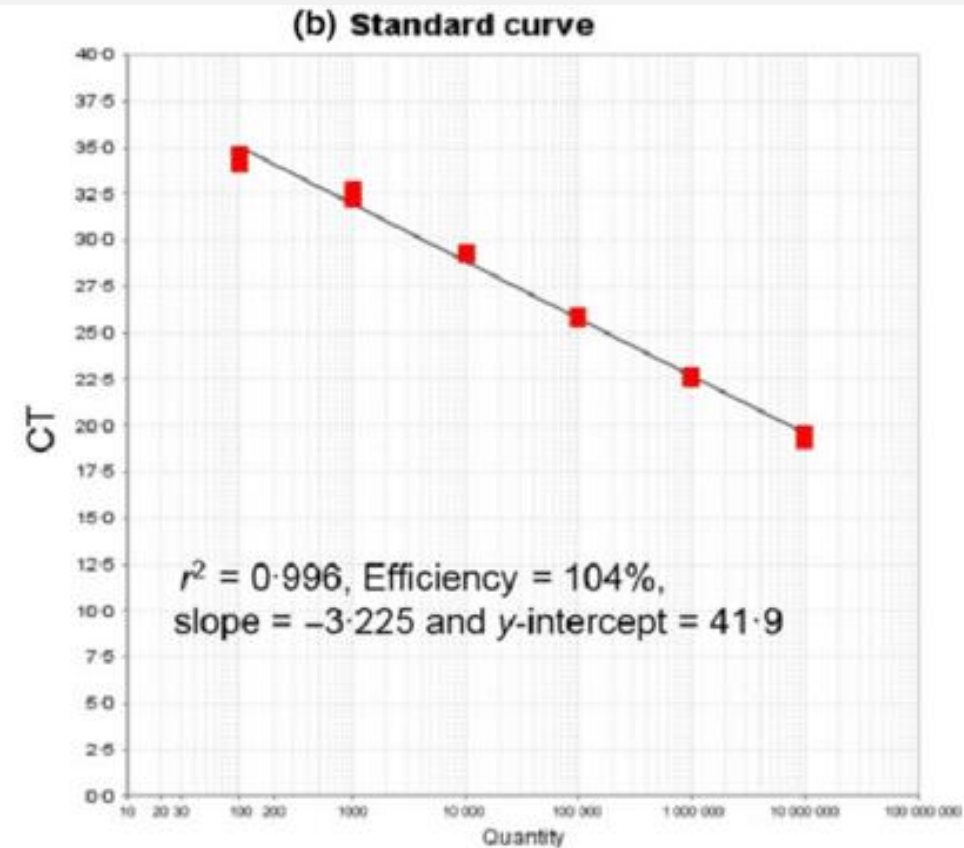
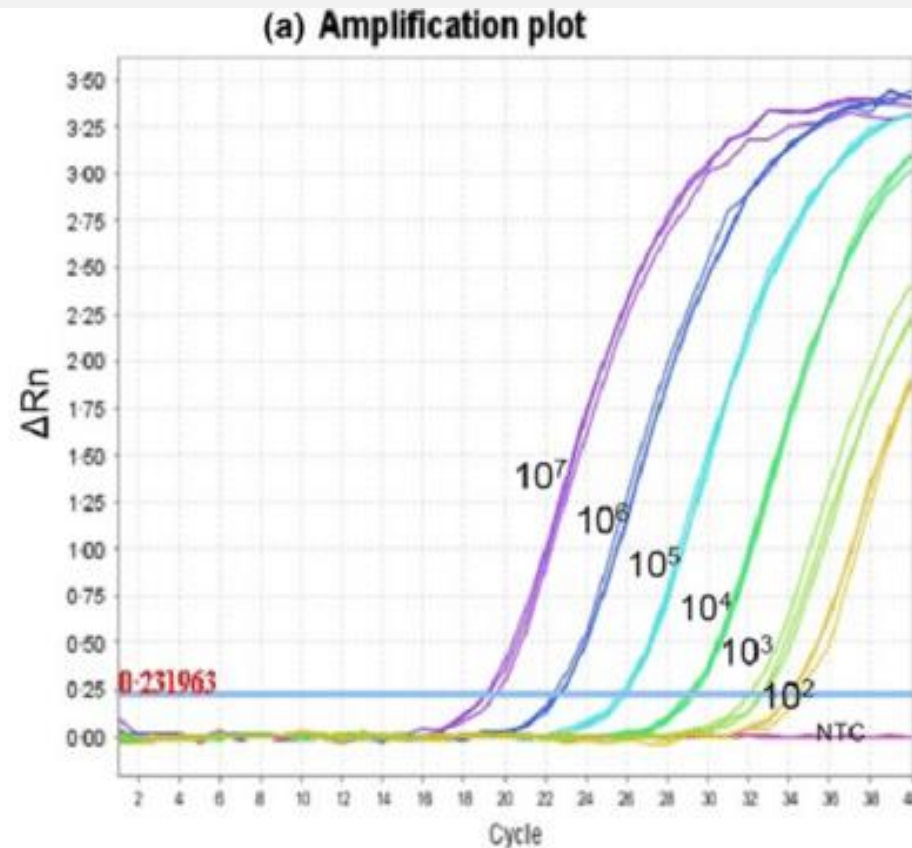


Giá trị CT trong xét nghiệm SARS-CoV-2



Đường cong chuẩn (Standard Curve)

PCR định lượng = qPCR



Đường chuẩn realtime PCR (phải) dựng từ giá trị Ct và nồng độ của các mẫu chuẩn (Std)



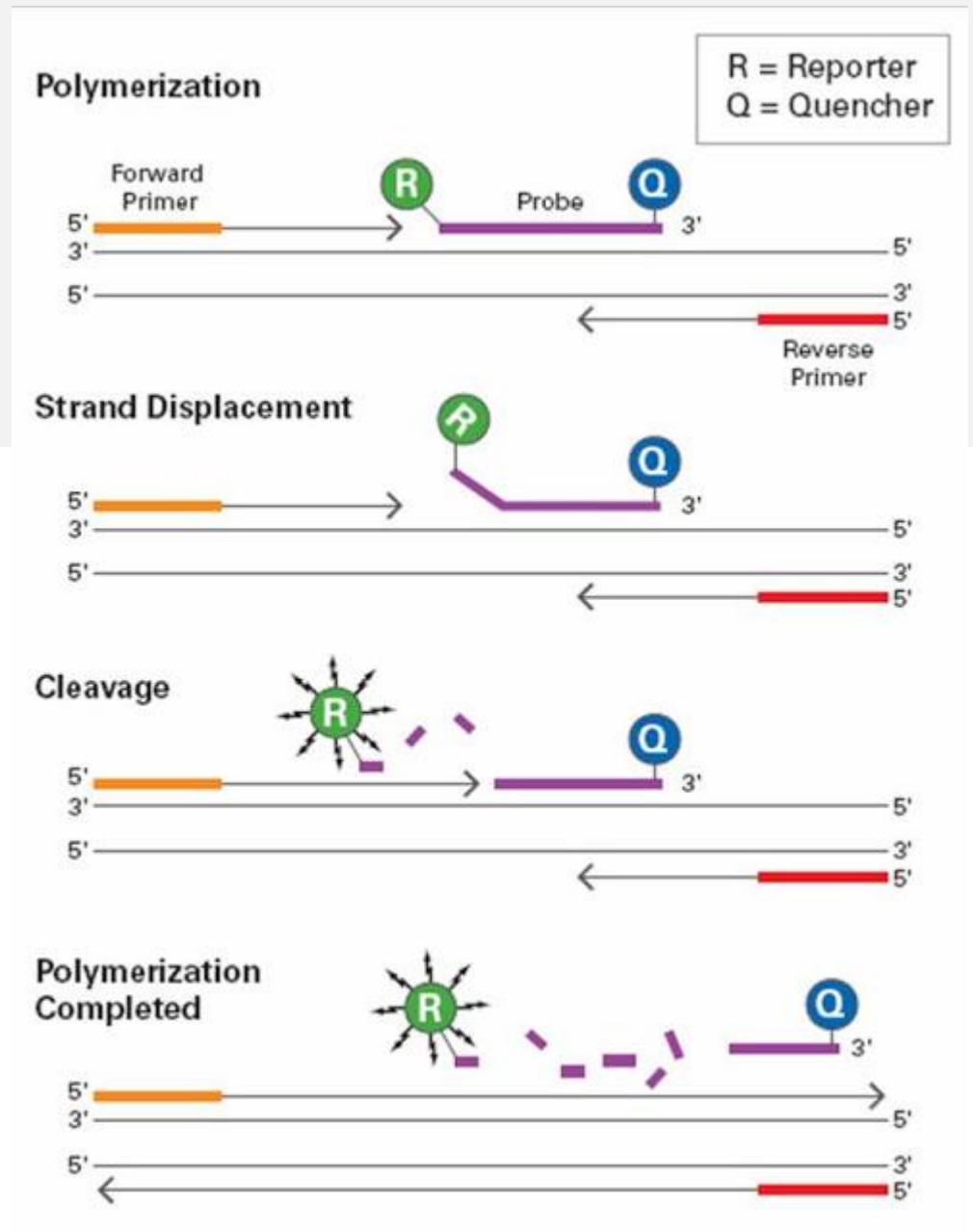
Tín hiệu huỳnh quang trong real-time PCR

Nhiều phương pháp khác nhau

- Chất nhuộm khi chèn vào DNA sẽ phát huỳnh quang
 - SYBR Green 1
- Probe đặc hiệu gắn huỳnh quang
 - Taqman probe
 - Beacon
 - Hybridization probe

Taqman probe

- Ưu
 - Probe đặc hiệu
 - Multiplex PCR
- Nhược
 - Đắt



Video minh họa: Taqman probe



Real-time PCR: **phát hiện tác nhân trong mẫu**

- Đơn giản, nhanh chóng
- Dễ biện luận, phân tích kết quả
- Tránh ngoại nhiễm (không cần phân tích hậu-PCR)
- Khả năng định lượng lớn ($\log 7$ - $\log 8$)
- Độ nhạy > PCR
- Độ đặc hiệu > PCR

CÔNG CỤ PHÙ HỢP VÀ HIỆU QUẢ RẤT CAO CHO VI SINH LÂM SÀNG

Real-time PCR: định lượng tác nhân trong mẫu

- Vi-rút: ứng dụng rộng rãi

- HIV
- HBV
- HCV

THEO DÕI DIỄN TIẾN ĐIỀU TRỊ VÀ HIỆU QUẢ PHÁC ĐỒ

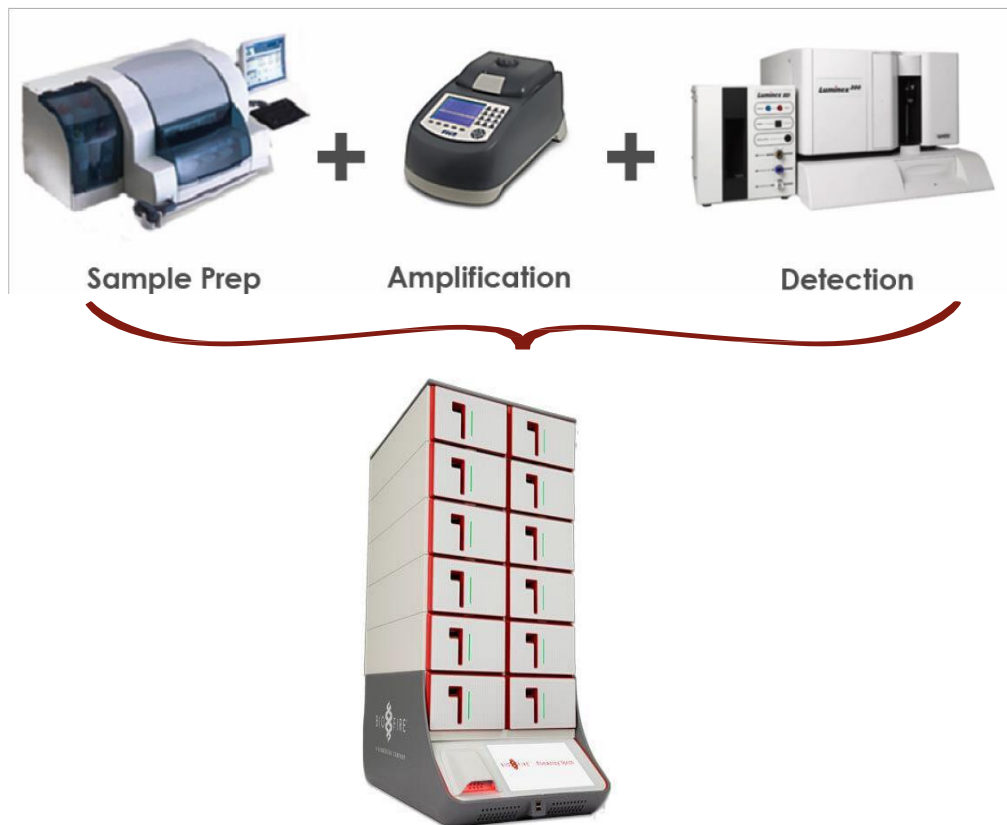
- Đang hot hiện nay: SARS-CoV-2

NGUY CƠ LÂY NHIỄM

- Vi khuẩn: ít phổ biến hơn

PCR “lồng” “đa môi”

BIOFIRE[®] FILM ARRAY[®] SYSTEM



Fast and Easy

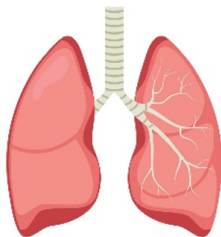
- Two minutes of hands-on time
- Run time of about an hour

Comprehensive

- Multiplex PCR
- Simultaneously tests for multiple pathogens

Panel(s)

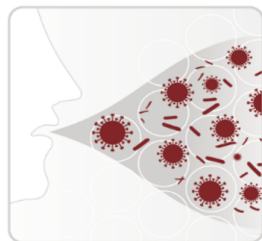
Pneumonia Panel Plus



34
targets

- 18 vi khuẩn
- 9 vi-rút
- 7 gen kháng

Respiratory Panel 2.1 Plus



23
targets

- 4 vi khuẩn
- 19 vi-rút
(**SARS-CoV-2**)

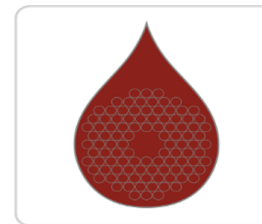
Meningitis Encephalitis Panel



14
targets

- 6 vi khuẩn
- 7 vi-rút
- 1 nấm

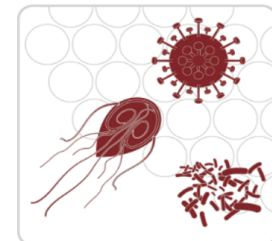
Blood Culture Identification 2 Panel



43
targets

- 26 vi khuẩn
- 7 nấm
- 10 gen kháng

Gastrointestinal Panel



22
targets

- 13 vi khuẩn
- 5 vi-rút
- 4 ký sinh trùng

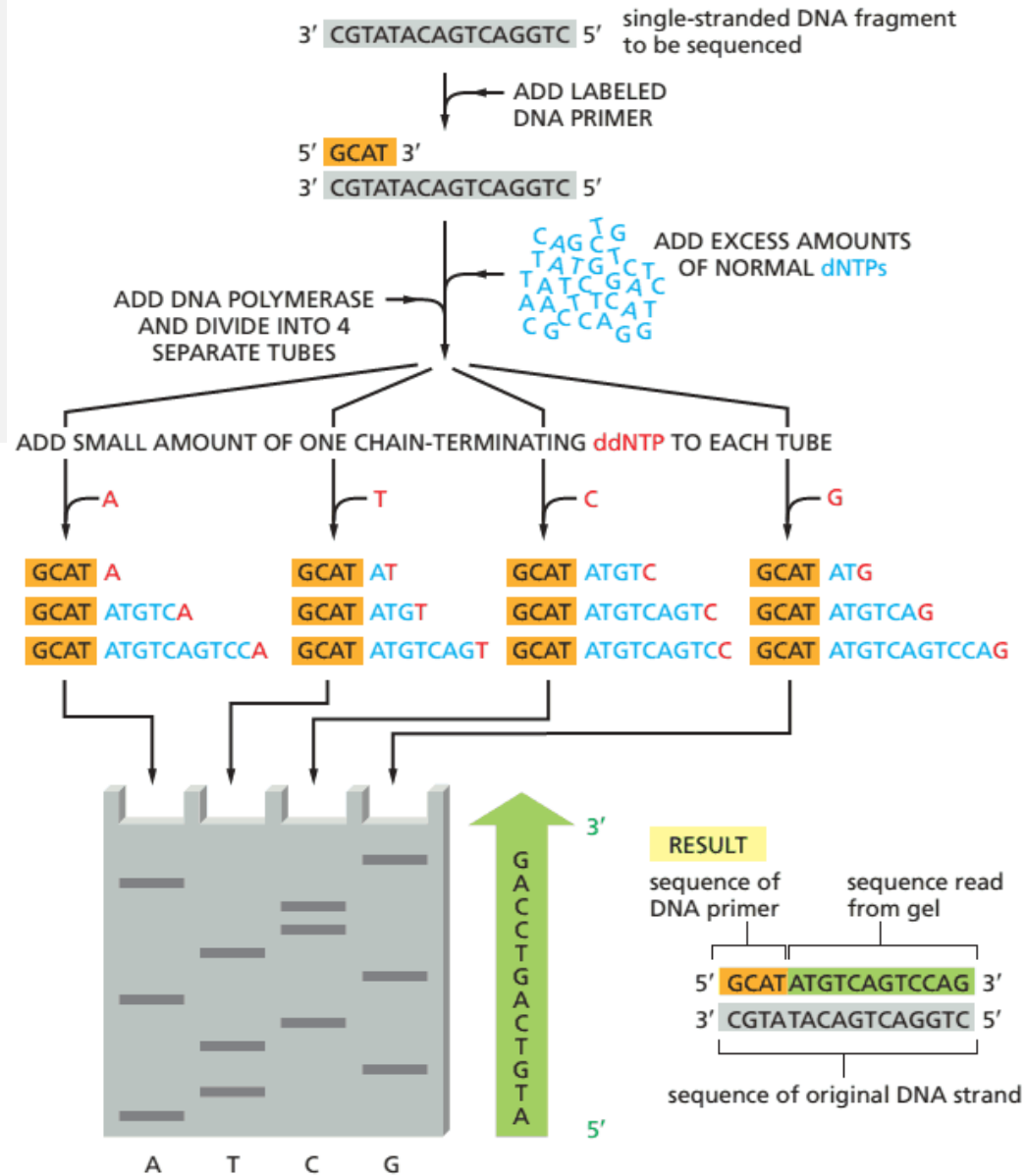


Giải trình tự gen

- **Human Genome Project (2003)**
- **Các thể hệ giải trình tự: 1, 2, 3, 4**
- **Những ứng dụng đặc biệt: giải trình tự 16S rRNA**

Thế hệ thứ nhất

Nguyên lý: kết thúc chuỗi bằng ddNTP

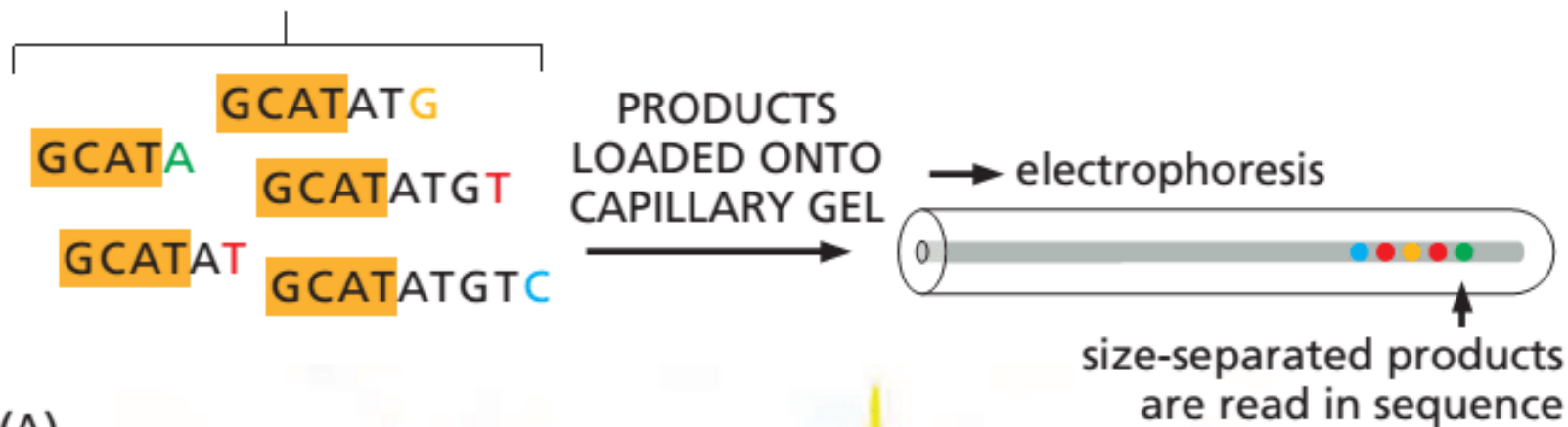


NGUYÊN LÝ GIẢI TRÌNH TỰ SANGER

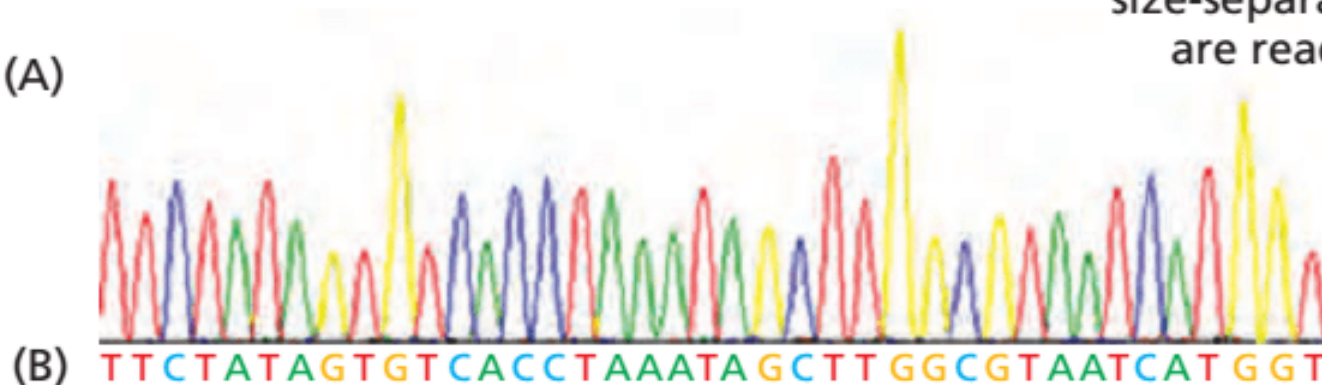
Phương pháp Sanger cải tiến

AUTOMATED DIDEOXY SEQUENCING

mixture of DNA products, each containing a chain-terminating ddNTP labeled with a different fluorescent marker



(A)



(B)

NGS = Next Generation Sequencing (Từ thế hệ thứ hai trở đi)

Thế hệ thứ hai

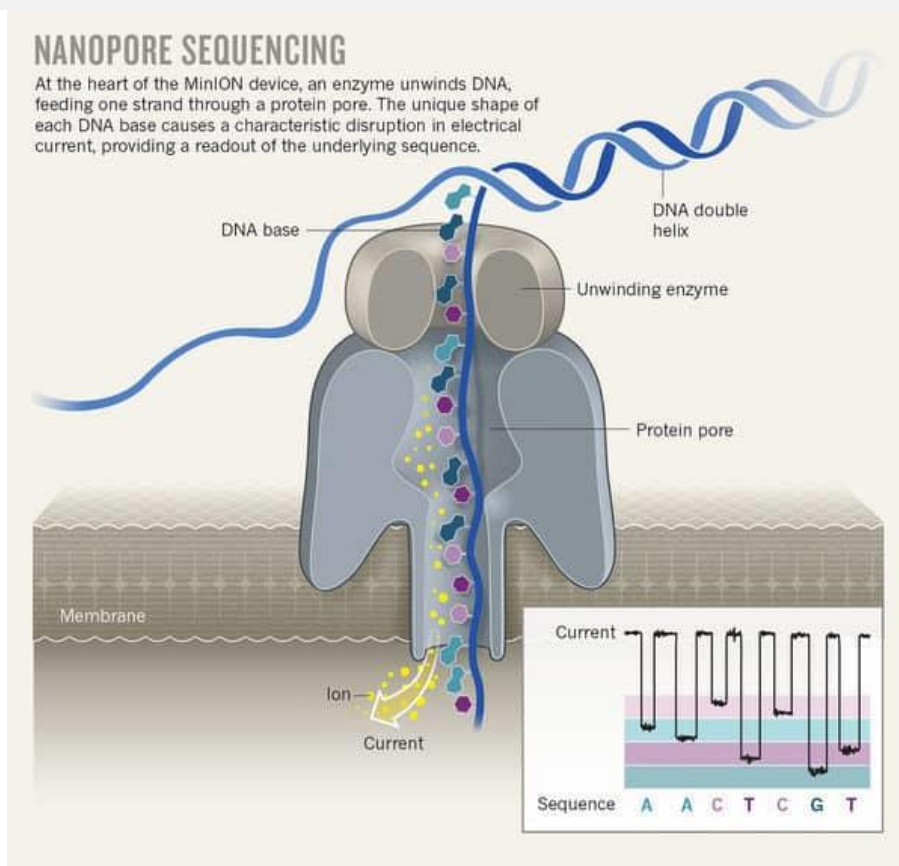
- **Pyrosequencing**: phát hiện sự giải phóng pyrophosphate khi dNTP được thêm vào chuỗi
- **Ion Torrent Sequencing/Ion Semiconductor Sequencing**: phát hiện tín hiệu điện do ion H^+ giải phóng ra trong quá trình tổng hợp DNA
- **Illumina**: ghi tín hiệu huỳnh quang gắn vào nucleotide

Thế hệ thứ ba

- **SMRT = Single Molecular Real-Time Sequencing**: giải trình tự đơn phân tử thời gian thực bằng cách ghi nhận tín hiệu huỳnh quang đơn phân tử

Thế hệ thứ tư

Oxford Nanopore Sequencing Technology



Nguyên lý: sử dụng dòng điện để vận chuyển một mẫu chưa biết qua một lỗ $d=1\text{nm}$



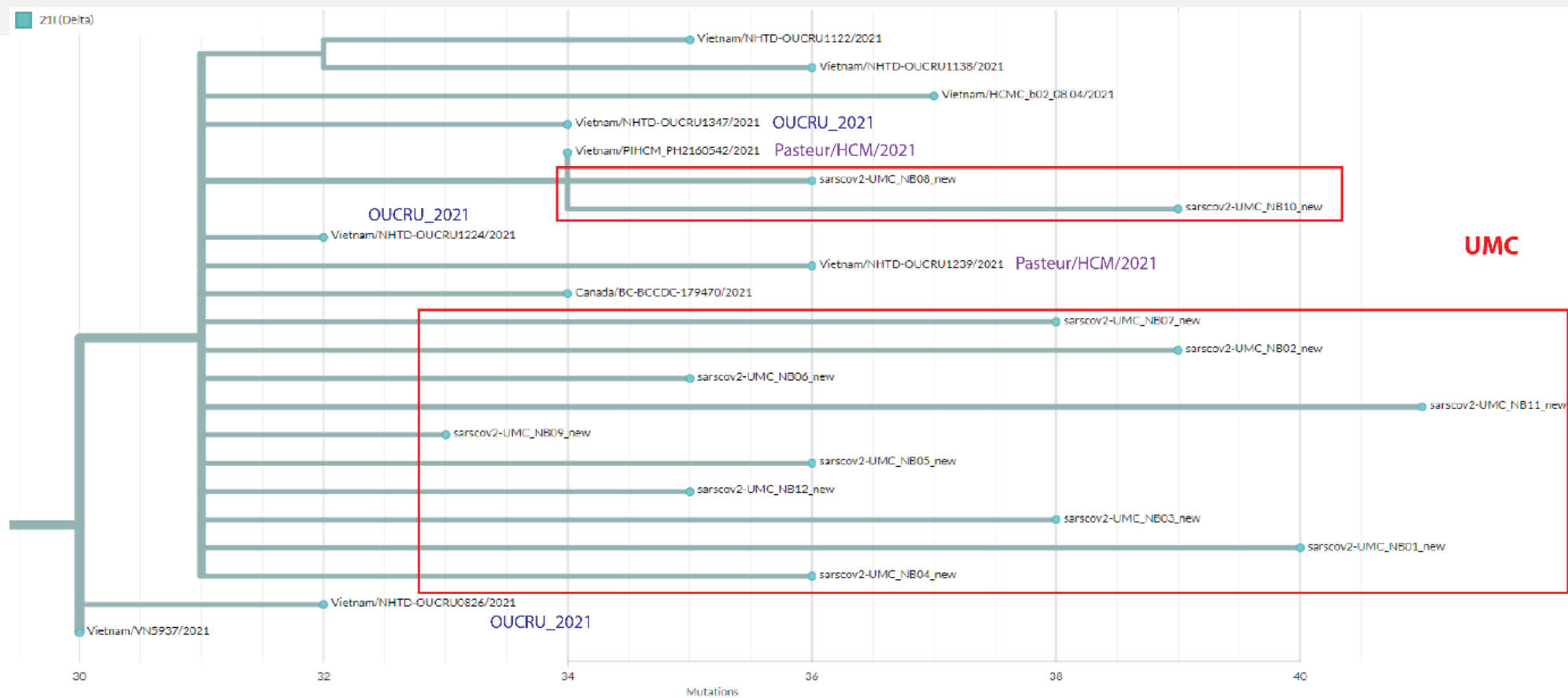
Xác định biến chủng SARS-CoV-2 (PANGOLIN)

 Reset entries Upload another file			
File name	Sequence name	Lineage	
— ANALYSED (Click tick icon for more info) 12 sequences			
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB01	AY.26	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB02	AY.24	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB03	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB04	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB05	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB06	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB07	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB08	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB09	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB10	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB11	B.1.617.2	  
✓ all_sarscov2-UMC2-V2_medaka.fasta	sarscov2-UMC_NB12	B.1.617.2	  

NEXTSTRAIN (GISAID & WHO)

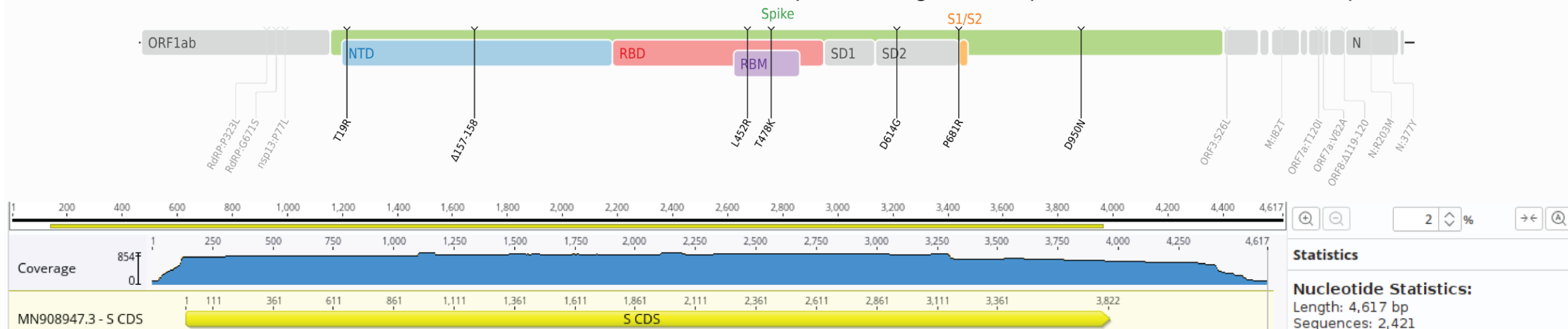
ID	Sequence name	QC	Clade	Mut.	non-ACGTN	Ns	Gaps	Ins.	FS	SC	Nucleotide sequence
9	✓ sarscov2-UMC_NB01	NMPCFS	21I (Delta)	39	0	182	13	0	0	0	
0	✓ sarscov2-UMC_NB02	NMPCFS	21I (Delta)	38	0	181	13	0	0	0	
8	✓ sarscov2-UMC_NB03	NMPCFS	21I (Delta)	37	0	298	13	0	0	0	
11	✓ sarscov2-UMC_NB04	NMPCFS	21I (Delta)	35	0	184	13	0	0	0	
6	✓ sarscov2-UMC_NB05	NMPCFS	21I (Delta)	35	0	182	13	0	0	0	
2	✓ sarscov2-UMC_NB06	NMPCFS	21I (Delta)	34	0	223	13	0	0	0	
1	✓ sarscov2-UMC_NB07	NMPCFS	21I (Delta)	37	0	182	13	0	0	0	
5	✓ sarscov2-UMC_NB08	NMPCFS	21I (Delta)	33	0	182	13	0	0	0	
4	✓ sarscov2-UMC_NB09	NMPCFS	21I (Delta)	32	0	183	13	0	0	0	
10	✓ sarscov2-UMC_NB10	NMPCFS	21I (Delta)	38	0	181	13	0	0	0	
3	✓ sarscov2-UMC_NB11	NMPCFS	21I (Delta)	40	0	1142	13	0	0	0 (1)	
7	✓ sarscov2-UMC_NB12	NMPCFS	21I (Delta)	33	0	882	13	0	0	0	
Genome annotation ?											

NEXTCLADE



S gene (mã hóa protein gai)

Amino acid mutations of SARS-CoV-2 Delta variant plotted on a genome map of SARS-CoV-2 with a focus on Spike



MALDI-TOF (Khối phổ)

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

Developed in 1980's by :
Karas & Hillenkamp in Germany and Tanaka et al in Japan.

Anal. Chem. **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses
Exceeding 10 000 Daltons

Michael Karas*
Franz Hillenkamp

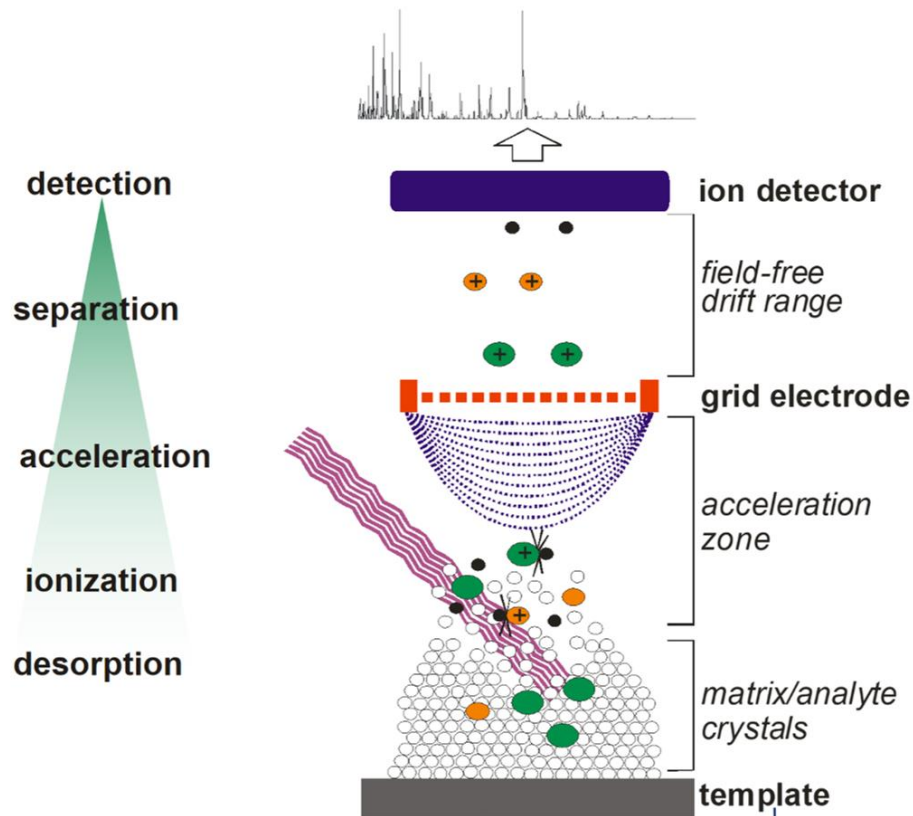
**Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000
by Laser Ionization Time-of-flight Mass
Spectrometry**

Koichi Tanaka[†], Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida
and Tamio Yoshida
Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

First commercial apparatus in 1991
Nobel Prize for Chemistry to K. Tanaka in 2002

Nguyên lý cơ bản MALDI-TOF

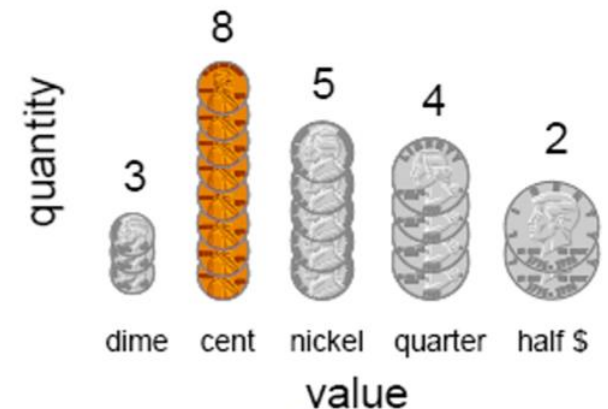


Sorting and Counting

- *Pocket change (mixture of coins)*
- *Penny, dime, nickel, quarter, half \$*
- *Sorting change by value or size*
- *Concept of visual interpretation*



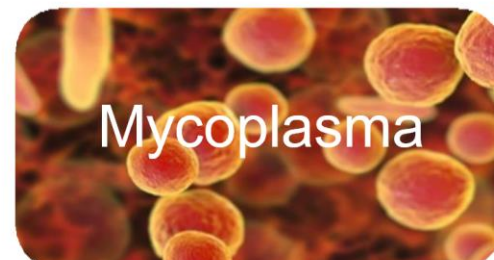
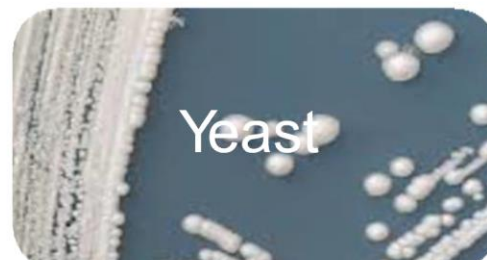
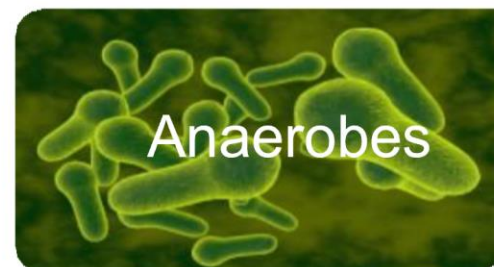
- *Mixture of molecules*
- *Molecules of different weight, size*
- *Separation by mass*
- *spectrum*



Thư viện **cập nhật**



THƯ VIỆN HIỆN TẠI: 1316 SPECIES





Chẩn đoán các **bệnh lý nhiễm trùng**

- **Chính xác** vs **kịp thời**
- Định hướng khởi đầu phác đồ điều trị
- Theo dõi diễn tiến/kháng thuốc
- Phòng ngừa lây lan thành dịch



Tác nhân gây bệnh: **vi-rút**

- **Nuôi cấy**

- Kinh nghiệm, thời gian, chi phí
- Độ nhạy thấp (khó mọc, không mọc)

- **Huyết thanh/Miễn dịch**

- Độ nhạy thấp (nồng độ KN thấp, giai đoạn cửa sổ → khó phát hiện)
- Trình độ kỹ thuật phát triển kit

- **Nhu cầu: cần sàng lọc nhanh để đối phó dịch**



Quyết định phác đồ Rx, theo dõi, tiên lượng

- Chẩn đoán xác định: giai đoạn cửa sổ
- Theo dõi điều trị: định lượng HIV, HBV, HCV
- Tiên lượng: kiểu gen HPV, HCV, HSV
- Xác định đột biến kháng thuốc: HBV kháng lamivudine, đột biến pre-core làm mất HBeAg
- Xác định biến chủng: giải trình tự SARS-CoV-2



Tác nhân gây bệnh: **vi khuẩn**

- Định danh dựa trên gen đích phổ biến
 - 16S ribosomal RNA
 - Cấu trúc thiết yếu, có tính bảo tồn cao
 - Giải trình tự gen mã hóa 16S rRNA



Vi khuẩn mọc chậm, khó/không nuôi cấy

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Legionella* spp.
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- ...



Mycobacterium tuberculosis

- **Gen đích IS6110: chẩn đoán xác định nhanh & chính xác**
- **Hữu ích trong các trường hợp nhuộm soi (BK đằm) âm tính**
- **Đặc biệt hữu ích giúp chẩn đoán xác định các trường hợp lao ngoài phổi: màng não, khớp, màng bụng, màng tim, xương**
- **Xác định lao kháng thuốc (kiểu gen): định hướng lựa chọn phác đồ RX**

Ứng dụng **SHPT** trong cấy máu

Vài giờ: tác nhân
+ gen kháng

5 phút: tác nhân

Lấy máu → chai cấy máu → tủ cấy máu

Bước 1 (24 giờ đầu)

Chai cấy máu mọc
PCR

Chai cấy máu + → cấy ria thạch → tủ ủ

Bước 2 (24 giờ thứ hai)

Mọc trên thạch
Vitek MS

Thạch → định danh

Bước 3 (24 giờ thứ ba)

Kết quả định danh

KQ định danh → KSD

Bước 4 (24 giờ thứ tư)

Kháng sinh đồ

Kết quả: tác nhân + kháng sinh đồ. Tổng thời gian quy ước: 96 giờ (sau khi chỉ định)



Phân biệt tái phát vs tái nhiễm

- Tính đa hình kiểu gen
- Ví dụ điển hình: SARS-CoV-2 (với 5 biến chủng VOC hiện nay)
 - α
 - β
 - γ
 - δ
 - o



Giới hạn của sinh học phân tử

- Nhân sự VIP
- Thiết bị kỹ thuật cao
- Giá thành từng xét nghiệm đắt
- Khả năng phát hiện tác nhân **giới hạn** trong từng kỹ thuật (primer trong các kỹ thuật PCR, thư viện của khối phổ)
- Sự không đồng nhất trong các bộ kit, quy trình
- Tâm lý e ngại đầu tư (những cái mới, đắt tiền)



Tóm tắt

- Chẩn đoán vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng: **truyền thống** vs **công nghệ**
- Sinh học phân tử
 - Genomics
 - Proteomics
- Ưu vs nhược điểm



Thông tin liên hệ

TS.BS. Huỳnh Minh Tuấn

Phó Trưởng Bộ môn Vi sinh – Ký sinh, Khoa Y

Đại Học Y Dược TP.HCM

Cell: +84 90 934 9918

Email: huynh.tuan@umc.edu.vn



Chân thành cảm ơn
Quý Học viên