

Chương 7:

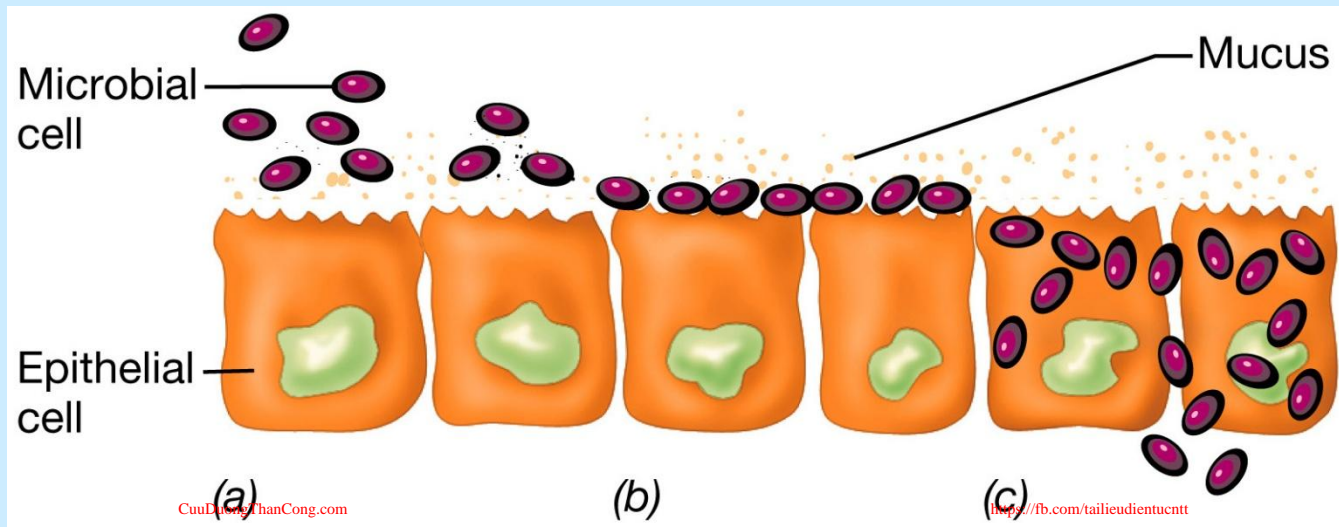
Vi sinh vật gây bệnh ở người

- 1. Quan hệ vật chủ – ký sinh**
- 2. Cơ sở miễn dịch học**
- 3. Vi sinh y học**
- 4. Dịch tễ học và vi sinh vật học cộng đồng**
- 5. Bệnh do vi sinh vật**

Quan hệ vật chủ – ký sinh

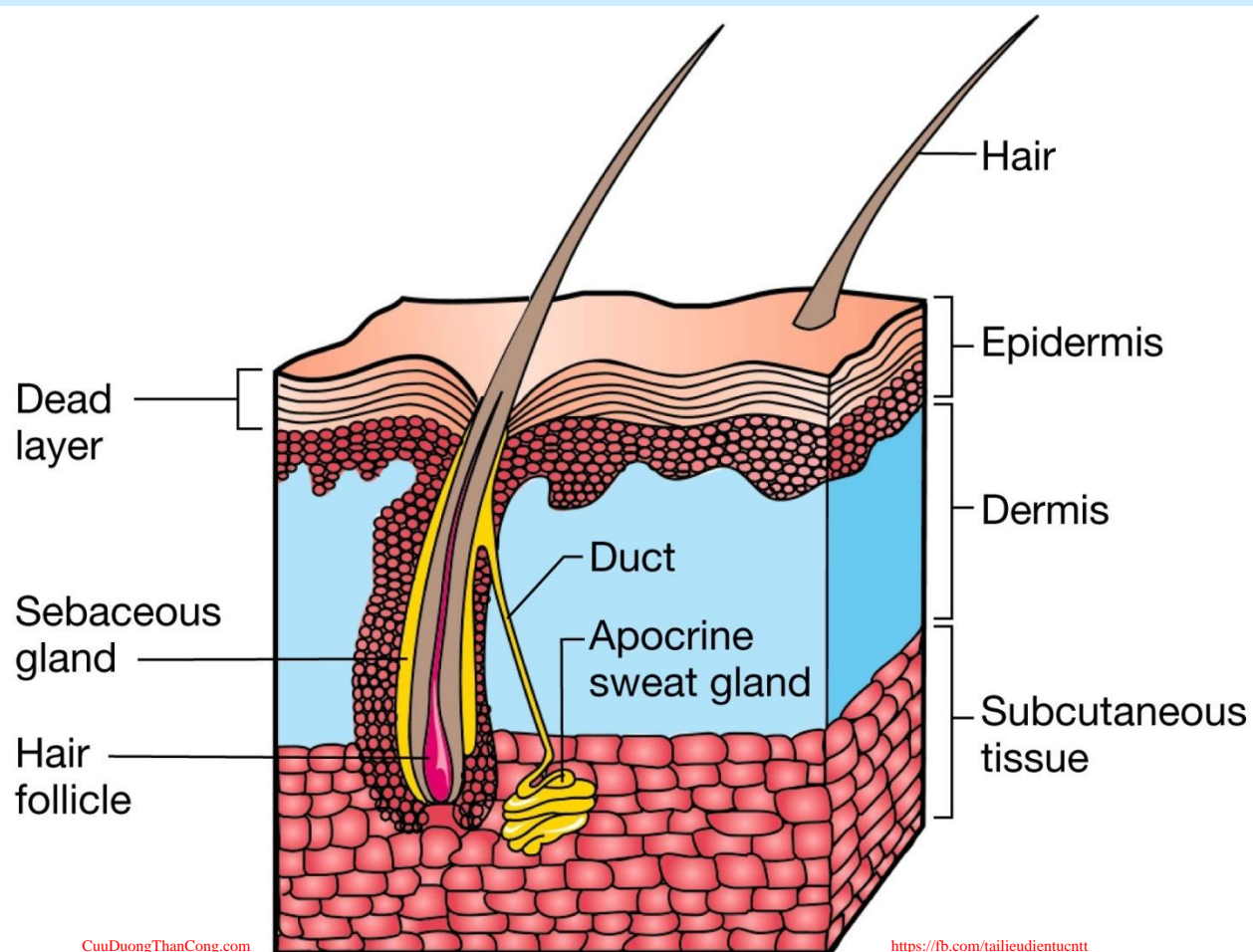
Tương tác của vi sinh vật với động vật

- Động vật là môi trường sống của nhiều vi sinh vật: vi sinh có lợi, gây bệnh và trung tính
- Ký sinh (parasitism): sự tăng trưởng của một VSV (ký sinh vật, parasite) ở sinh vật khác, không mang lại ích lợi gì hoặc làm hại cho sinh vật chủ hay (hay vật chủ host)
- Khả năng ký sinh của VSV lên vật chủ chịu ảnh hưởng của những tương tác phức tạp giữa ký sinh vật với vật chủ:
 - + Khả năng xâm nhập của VSV vào vật chủ (thường bắt đầu ở các màng nhày)
 - + Tương tác giữa hệ thống tự vệ của vật chủ với khả năng đáp ứng thích nghi của ký sinh gây bệnh
 - + Đặc điểm giải phẫu học của vật chủ



Hệ vi sinh vật tự nhiên ở da

- Độ ẩm thấp và pH acid
- Hệ VSV chủ yếu là các vi khuẩn Gram dương, hiện diện ở nơi có độ ẩm cao như tuyến mồ hôi, tuyến nhờn: *Staphylococcus*, *Coryne-bacterium*, *Acetivobacter*, *Pityrosporum*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*



Hệ vi sinh vật ở vùng miệng

- Streptococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Coryne-bacterium, Neisseria, Actinomyces
- Sâu răng do hoạt động của VSV:

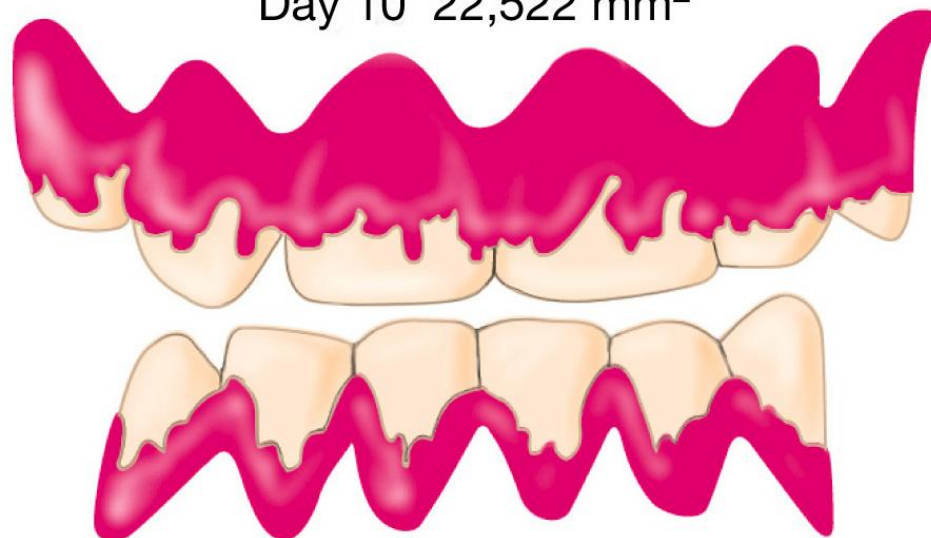
+ *Streptococcus sobrinus* và *S. mutans* hình thành lớp polysaccharide (glycocalyx) giúp gắn vào bề mặt răng tạo thành vết tan răng (dental plaque), tăng trưởng làm cạn kiệt ôxi

+ Vi khuẩn lactic acid tạo ra acid hữu cơ làm giảm pH ở bề mặt răng, làm tan thành phần calcium phosphate của răng, gây ra sâu răng.

Day 1 1436 mm²

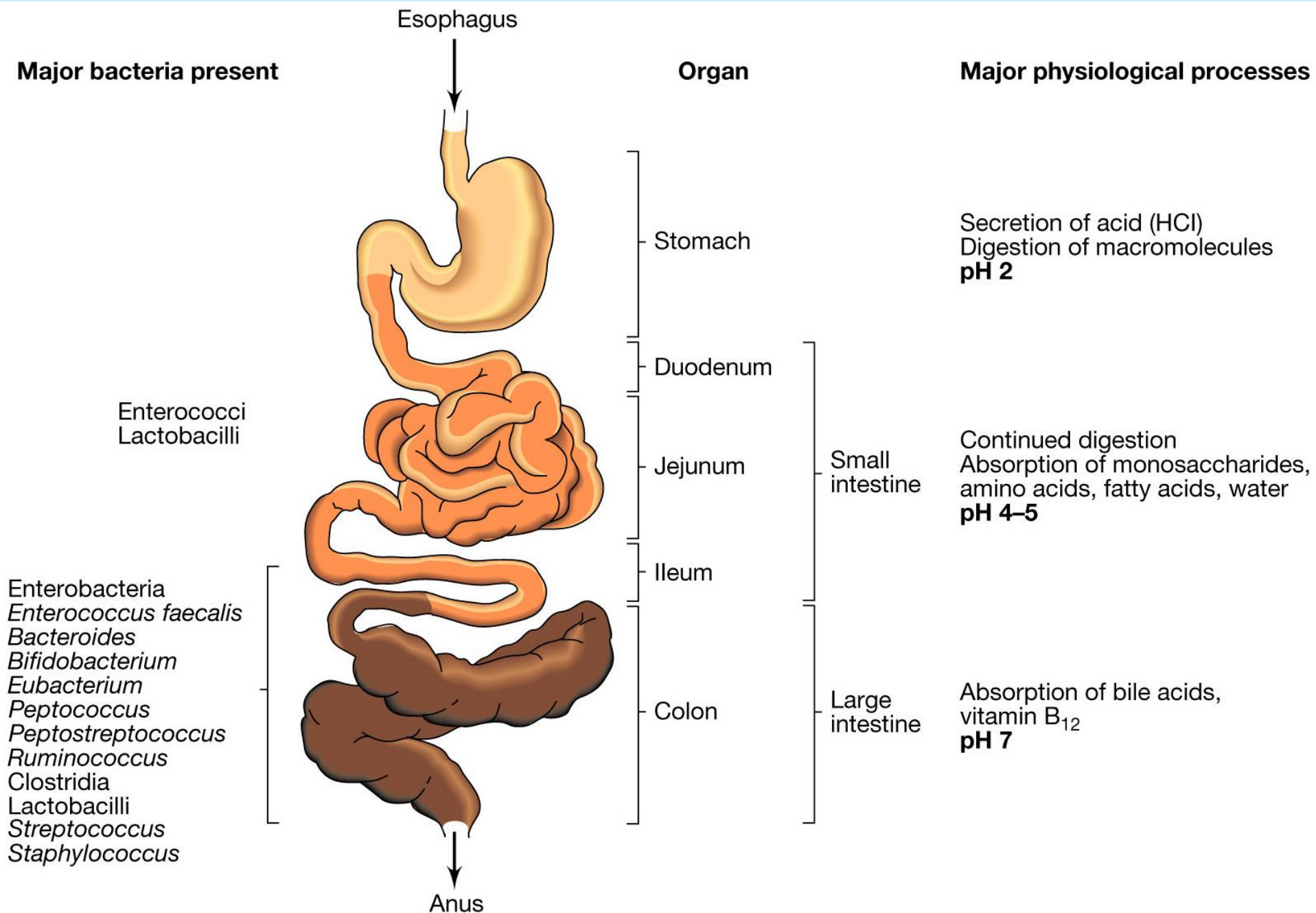


Day 10 22,522 mm²



Hệ vi sinh vật đường tiêu hóa

- **Lactobacillus, Streptococcus, Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Enterococcus, Staphylococcus**
- **VSV kỵ khí và kỵ khí tùy ý**
- **VSV có lợi - VSV lên men thối**
- **VSV có lợi: cung cấp vitamin, hỗ trợ biến dưỡng ở vật chủ**



Hệ vi sinh vật khác

- Hệ VSV đường hô hấp:

- + Streptococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Neisseria
- + Hiện diện bên trong màng nhày ở cơ quan hô hấp trên

- Hệ VSV đường niệu - sinh dục:

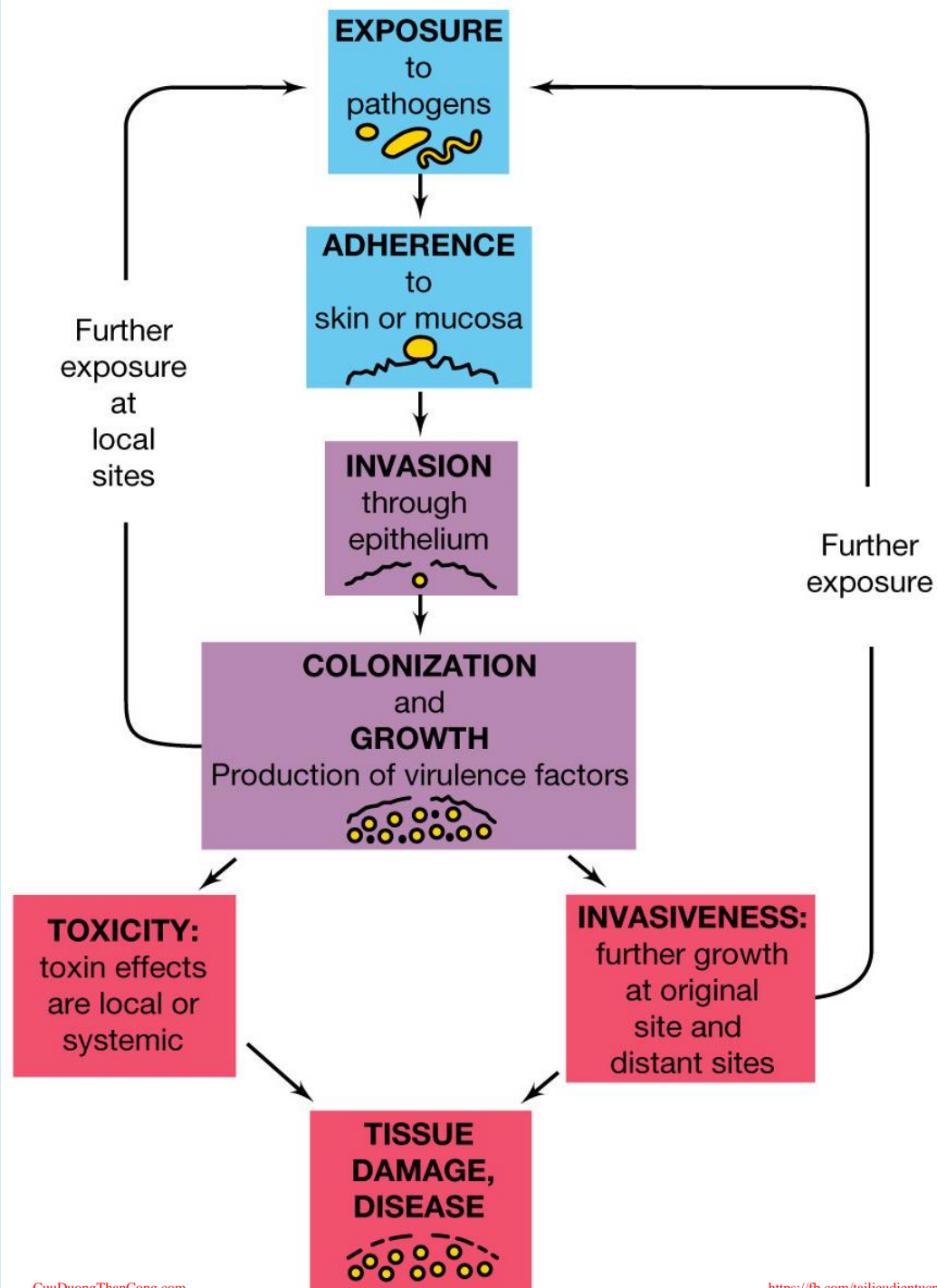
- + Escherichia, Klebsiella, Proteus, Neisseria, Lactobacillus, Corynebacterium, Staphylococcus, Candida, Prevotella, Clostridium, Peptostreptococcus

- Hệ VSV tự nhiên này có lợi:

- + Giúp cơ quan hoạt động bình thường
- + Ngăn cản sự xâm nhiễm của VSV gây bệnh
- + Một số có khả năng xâm nhiễm và gây bệnh bộ phận khác của cơ thể

Một số thuật ngữ trong cơ chế gây bệnh của VSV gây bệnh lên vật chủ

- **Nhược độc (attenuation):** sự giảm hoặc mất khả năng gây bệnh của VSV
- **Tạo khuẩn lạc (colonization):** sự sinh sản của VSV gây bệnh sau khi gắn được lên mô của vật chủ
- **Lây nhiễm (infection):** sự nhiễm và tăng trưởng của VSV bên trong vật chủ
- **Xâm nhiễm (invasion):** sự xâm nhập và lan truyền của VSV vào vật chủ
- **Tính xâm nhiễm (invasiveness):** tính gây bệnh do khả năng xâm nhập của VSV gây bệnh và lan truyền bên trong vật chủ
- **Sinh độc tố (toxigenicity):** tính gây bệnh do độc tố tạo ra bởi VSV gây bệnh
- **Mức gây bệnh (pathogenicity), mức ác tính (virulence) của ký sinh vật:** khả năng gây bệnh (tổng hợp của tính xâm nhiễm và sinh độc tố) của ký sinh vật ở vật chủ



Phương thức gây bệnh

- Tăng trưởng tạo sinh khối để gây bệnh (làm tắt mạch máu, van tim, đường trao đổi khí trong phổi...)
- Sản xuất ngoại độc tố (exotoxin) gây tổn thương, gây bệnh lên mô đích cách xa vị trí xâm nhập
- Nội độc tố (endotoxin) là thành phần lipopolysaccharide của màng ngoài, được phóng thích và gây bệnh khi tế bào bị chết

Xâm nhập của VSV gây bệnh vào vật chủ

- Thông qua sự gắn chuyên biệt của VSV lên biểu mô (specific adherence)
- Các mức chuyên biệt:
 - + Chuyên biệt mô (*Neisseria gonorrhoeae* chỉ gắn lên biểu mô đường niệu - sinh dục ở người)
 - + Chuyên biệt ký chủ
- Cơ chế gắn chuyên biệt qua tương tác giữa các đại phân trên bề mặt VSV với receptor trên tế bào ký chủ
- Xâm nhiễm (invasion): vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cơ thể, tăng trưởng và lan nhiễm theo hệ tuần hoàn

Tăng trưởng và lan nhiễm

- Sau khi xâm nhập vào bên trong cơ thể, để gây bệnh, VSV cần phân chia và tăng trưởng để đạt được mật độ có thể gây bệnh:
 - + Phân chia tại vị trí xâm nhiễm: tạo thành khuẩn lạc tại vị trí gây nhiễm
 - + Xâm nhiễm vào hệ bạch huyết và tích tụ tại hạch bạch huyết
 - + Xâm nhiễm vào máu và lan truyền khắp cơ thể
- Các yếu tố tăng cường sự tăng trưởng và lan nhiễm của VSV trong vật chủ:
 - + Nhiệt độ, pH, thế khử trong vật chủ
 - + Nhân tố ác tính (virulence factor) ở dạng các enzyme ngoại bào của VSV giúp VSV phá vỡ các thành phần cấu trúc mô, tiếp cận nguồn chất dinh dưỡng trong vật chủ
 - Hyaluronidase thủy phân keo hyaluronic acid giữa các tế bào giúp VSV khuếch tán vào nhiều tế bào của mô
 - Collagenase thủy phân collagen làm tan mô
 - Streptokinase thủy phân các cục fibrin (bao quanh nơi tế bào xâm nhiễm và tạo khuẩn lạc)
 - Protease, nuclease, lipase thủy phân các đại phân tử của tế bào chủ
- Các yếu tố hạn chế sự tăng trưởng của VSV trong vật chủ:
 - + Nguồn chất dinh dưỡng bị giới hạn trong vật chủ
 - + Hàm lượng thấp của kim loại vi lượng (Fe^{2+})

So sánh đặc điểm của ngoại độc tố (1) và nội độc tố (2)

- Hóa tính:

+ (1): protein, không bền nhiệt, tạo ra bởi vi khuẩn Gram - và +

+ (2): lipopolysaccharide, bền nhiệt, chỉ có ở vi khuẩn Gram -

- Phương thức, triệu chứng bệnh:

+ (1): chuyên biệt tế bào mục tiêu và phương thức gây bệnh

+ (2): không chuyên biệt, sốt, tiêu chảy, nôn mửa

- Độc tính:

+ (1): cao, gây chết

+ (2): yếu, ít khi gây chết

- Tính kháng nguyên:

+ (1): cao, kích thích sự tạo kháng thể trung hòa độc tố (antitoxin)

+ (2): yếu, đáp ứng miễn dịch không đủ để trung hòa độc tố

- Tính toxoid (độc tố bị xử lý bởi formaldehyde)

+ (1): formaldehyde trung hòa độc tính nhưng toxoid vẫn có tính kháng nguyên

+ (2): không

- Gây sốt: (1) không gây sốt, (2) gây sốt

Các loại ngoại độc tố

- **Độc tố tế bào (cytotoxin):** làm tan tế bào đích, ức chế sự sinh tổng hợp protein ở tế bào đích
- **Độc tố A-B (A-B toxin):** A và B nối cộng hóa trị, B gắn vào thụ quan tế bào đích, giúp A xâm nhập và gây bệnh
- **Độc tố siêu kháng nguyên (super antigen toxin):** gây siêu đáp ứng miễn dịch ở vật chủ

Độc tố tế bào

- Độc tố tan bào (cytolytic toxin): hemolysin

- + Được sản xuất bởi nhiều VSV gây bệnh (*Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*)

- + Có hoạt tính làm tan tế bào, được phát hiện bằng vòng tan huyết trên hộp thạch huyết

- + Các phương thức tác dụng:

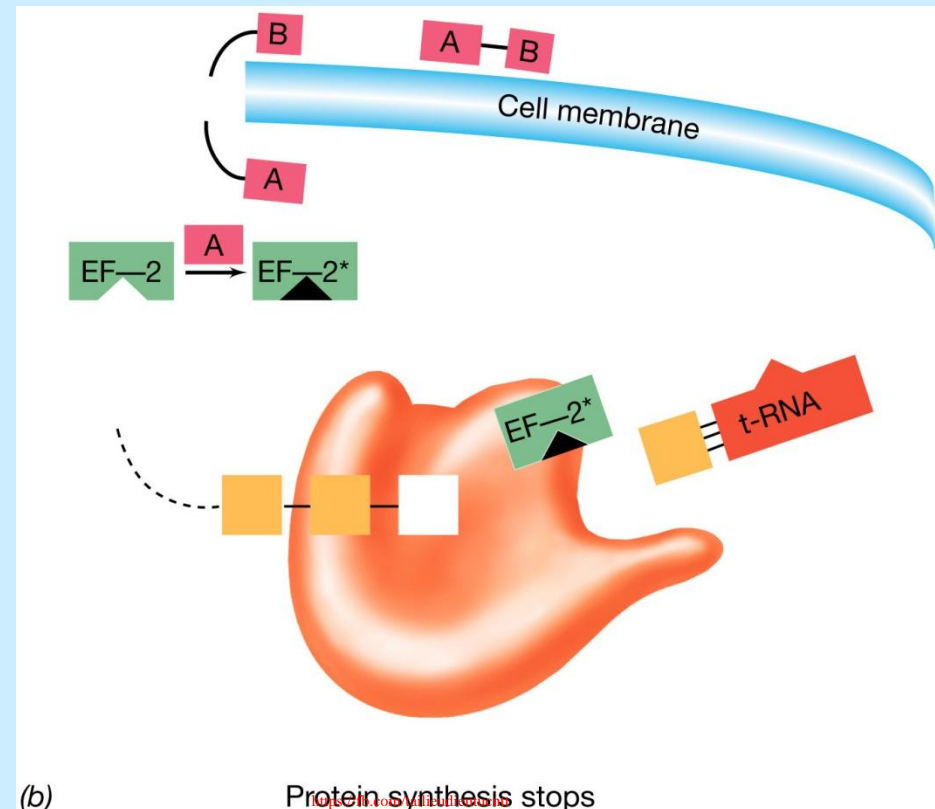
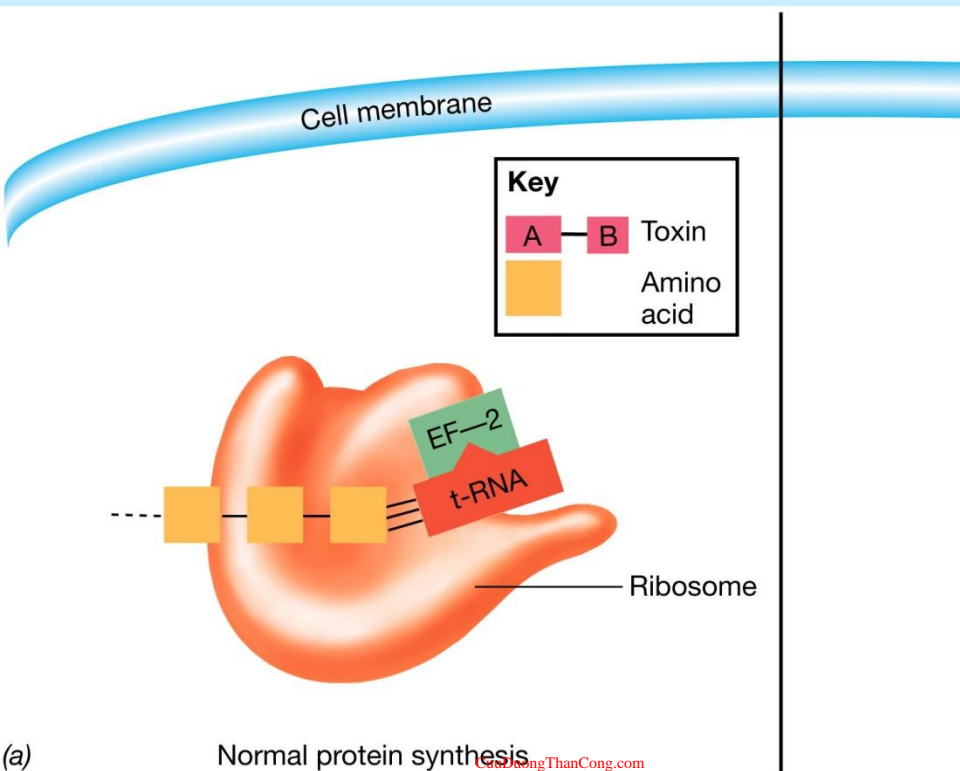
- (1) Thủy phân phosphatidylcholine của màng (lecithinase, phospholipase)

- (2) Thủy phân thành phần sterol của màng (streptolysin O)

- (3) Làm tan tế bào bạch huyết (leucocidin)

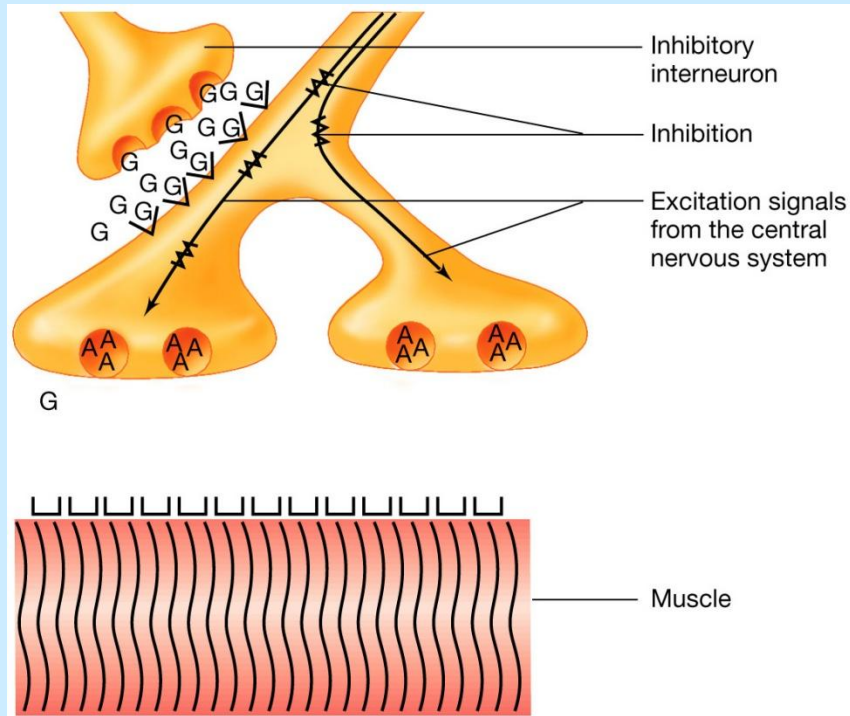
Độc tố A-B: diphtheria toxin

- Độc tố bạch hầu (diphtheria toxin):
 - + Cơ chế gây bệnh: đoạn A gắn cộng hóa trị ADP vào nhân tố kéo dài dịch mã EF-2 làm ngừng dịch mã ở tế bào đích
 - + Độc tố được mã hóa bởi gen *tox* trên bộ gen của phage β
 - + *Corynebacterium diphtheriae* trở nên có tính gây bệnh khi bị nhiễm và làm tan bởi phage này
 - + Fe^{2+} ức chế sự tạo thành diphtheria toxin bằng cách hoạt hóa repressor điều hòa sự phiên mã của gen *tox*



Độc tố A-B: tetanus toxin (độc tố uốn ván)

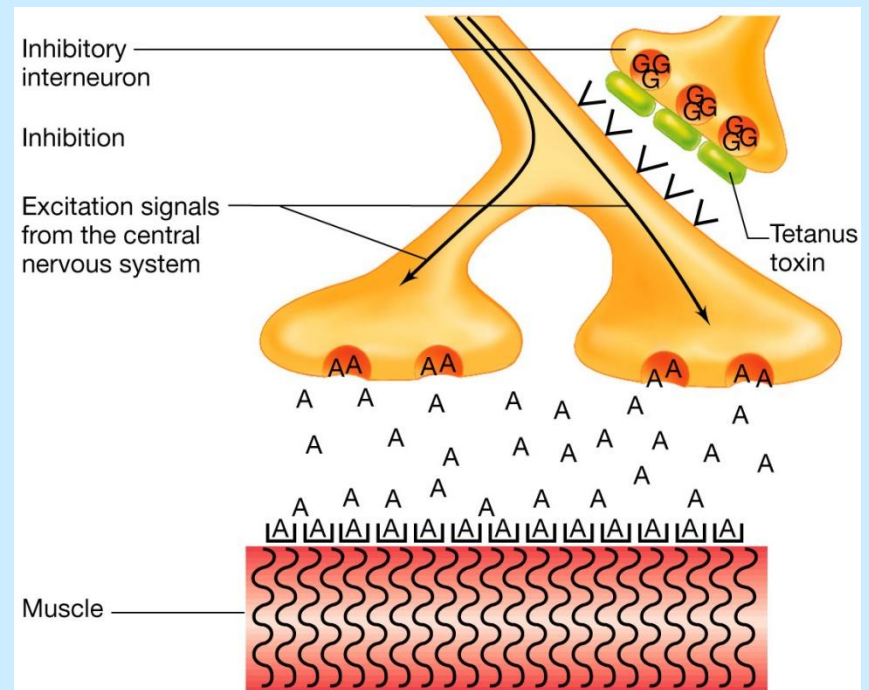
- Gây bệnh bằng cách tác động lên hệ thần kinh: neurotoxin
- Độc tố uốn ván (tetanus toxin), do *Clostridium tetani* tiết ra
 - + Đoạn A gắn vào ganglioside lipid ở đầu tế bào thần kinh ức chế ngăn cản sự phóng thích glycine là chất dẫn truyền ức chế sự phóng thích acetylcholine ở đầu dây thần kinh vận động
 - + Sự phóng thích liên tục của acetylcholine làm cơ co liên tục gây ra liệt cơ co



Normal

Glycine (G) release from inhibitory interneurons stops acetylcholine (A) release and allows relaxation of muscle

(a)



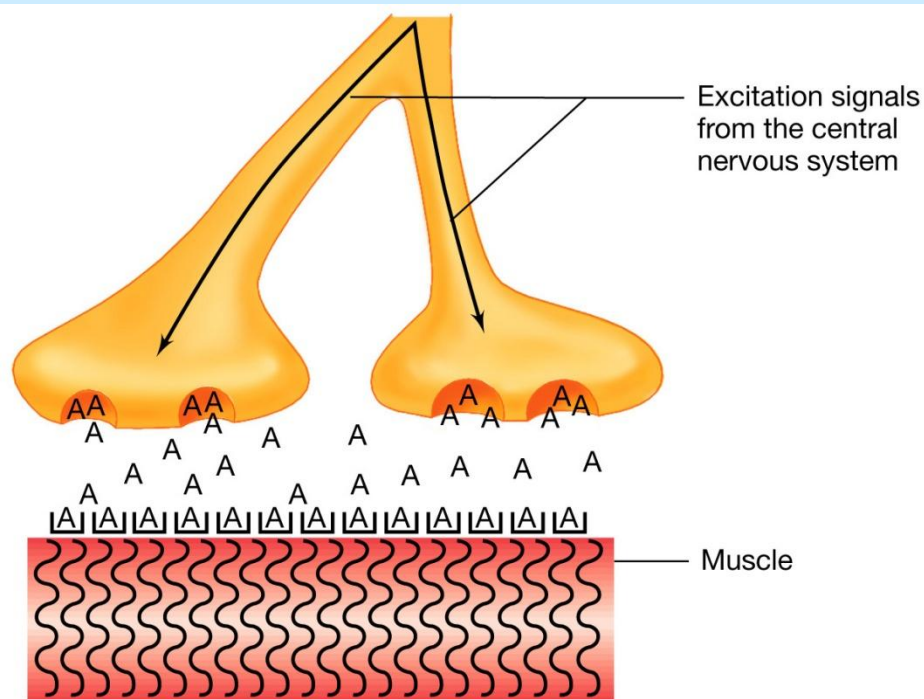
Tetanus

Tetanus toxin binds to inhibitory interneurons, preventing release of G and relaxation of muscle

(b)

Độc tố A-B: botulinum toxin

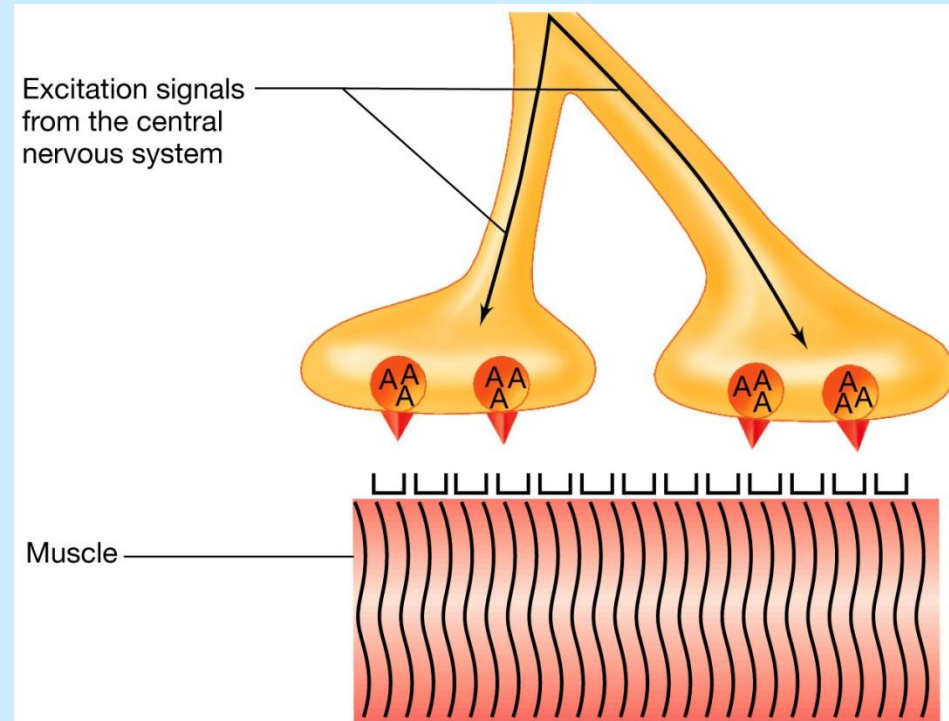
- Độc tố botulinum (botulinum toxin): 7 loại, độc tính cực mạnh (1mg làm chết 10^6 bọ thí nghiệm)
 - + Đoạn A gắn vào đầu dây thần kinh vận động, ngăn cản sự phóng thích acetylcholine gây liệt cơ giãn
 - + Do *Clostridium botulinum* nhiễm vào thực phẩm, gây ngộ độc
 - + Một số loài có gen mã hóa độc tố được nhận từ phage



Normal

Acetylcholine (A) induces contraction of muscle fibers

(a)



Botulism

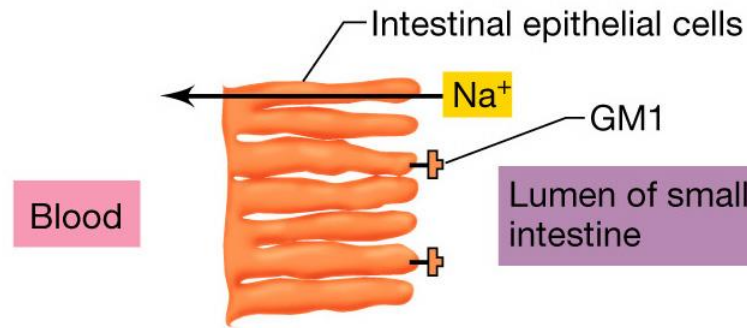
Botulinum toxin, , blocks release of A, inhibiting contraction

(b) <https://fb.com/tailieudientucntt>

Độc tố A-B: enterotoxin

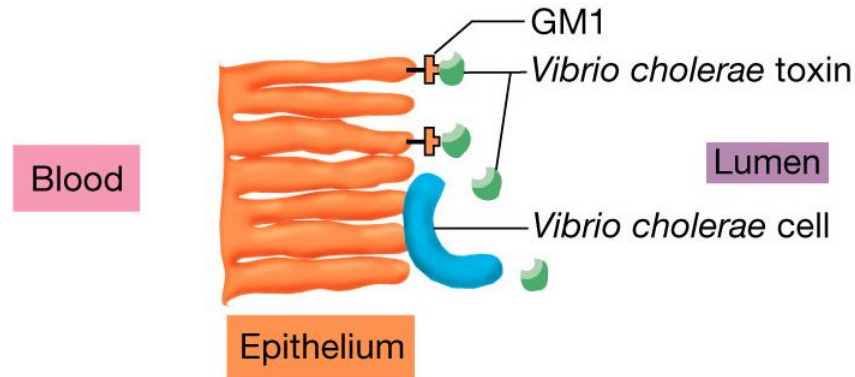
- Gây bệnh bằng cách tác động lên ruột non, làm tiết dịch dẫn đến hiện tượng tiêu chảy
- Được tạo ra bởi nhiều vi khuẩn như *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* và các VSV gây bệnh đường ruột như *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella enteridis*
- Độc tố tả (cholera toxin):
 - + Gồm một tiểu phần chức năng A và 5 tiểu phần nhận diện B có đích là GM1 glycolipid trên biểu mô ruột non
 - + A hoạt hóa adenyl cyclase để tổng hợp cAMP kích thích sự tiết Cl^- , HCO_3^- vào lòng ruột, dẫn đến sự thoát nước từ tế bào vào lòng ruột
 - + Được mã hóa bởi hai gen *ctxA* và *ctxB*
 - + *ctxA* và *ctxB* chịu sự kiểm soát dương bởi một protein điều hòa mã hóa bởi *toxR*
 - + *toxR* đồng thời kiểm soát sự biểu hiện của các nhân tố ác tính giúp sự tạo khuẩn lạc của *V. cholerae* ở thành ruột non

①



Normal ion movement, Na^+ from lumen to blood, no net Cl^- movement

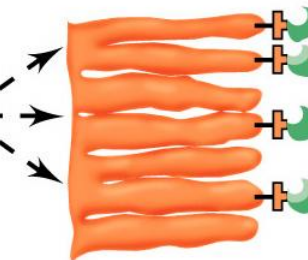
②



Colonization and toxin production

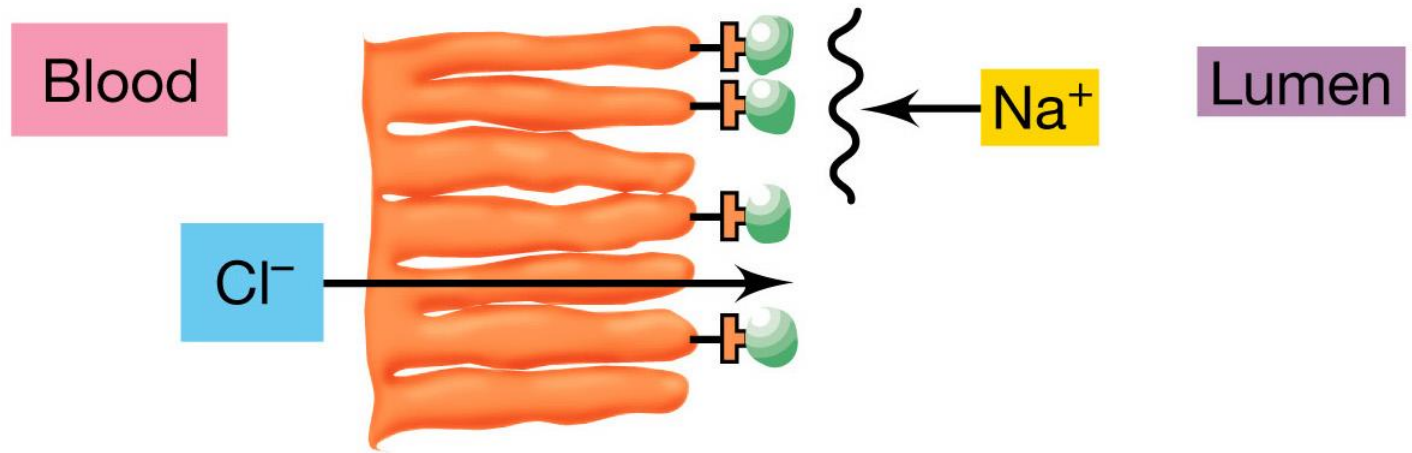
Cholera toxin
↓
Adenyl cyclase

ATP → Cyclic AMP



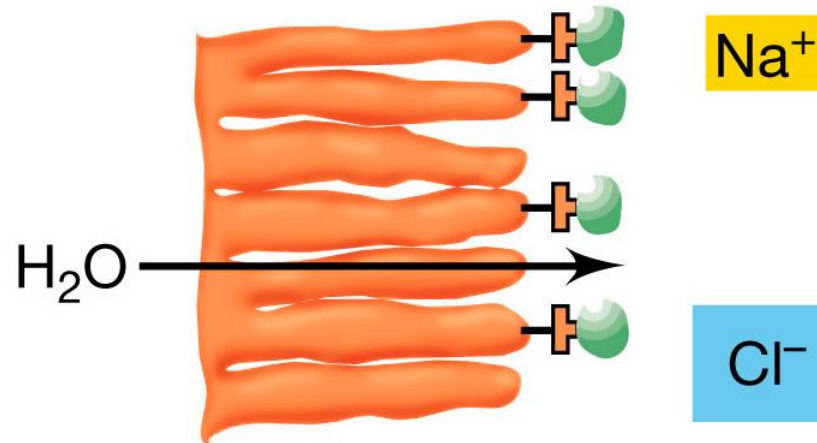
Activation of epithelial adenyl cyclase by cholera toxin

③



Na⁺ movement blocked,
net Cl⁻ movement to lumen

④



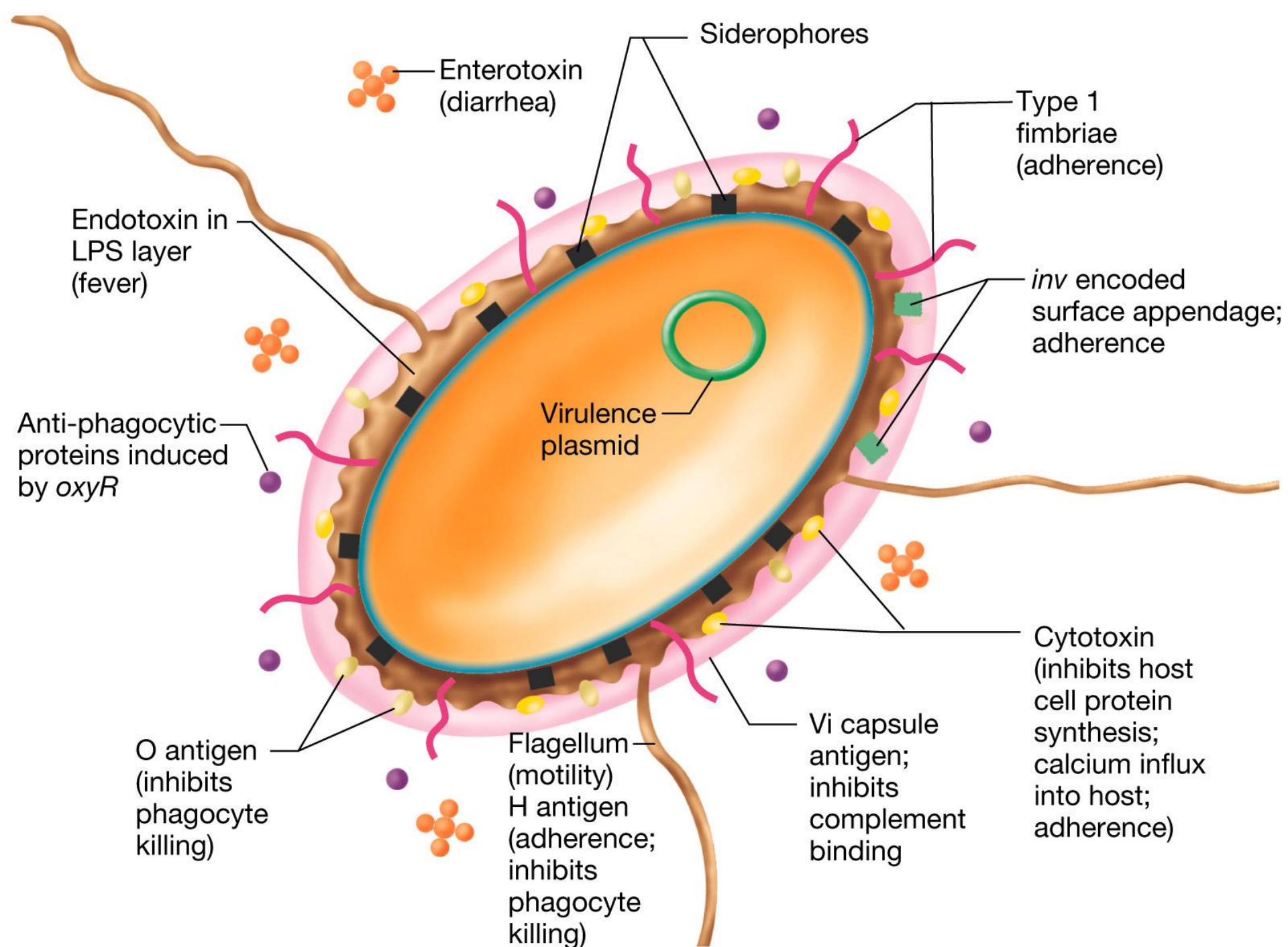
Massive water movement
to the lumen

Nội độc tố

- Là phần lipid A của lipopolysaccharide ở màng ngoài của vi khuẩn Gram -
- Được phóng thích khi vi khuẩn bị phân hủy hoặc tự phân
- Độc tính thường thấp hơn ngoại độc tố nhưng lượng độc tố lớn gây sốt, trạng thái viêm tổng thể có thể dẫn đến tử vong do shock xuất huyết
- Kháng sinh và thuốc được sản xuất bởi vi khuẩn Gram - cần được kiểm tra không nhiễm endotoxin bằng một xét nghiệm lipid A rất nhạy (10 - 20pg/ml) dựa trên phản ứng tạo tủa đục giữa nội độc tố với dịch tan tế bào từ con sam

Mức ác tính (virulence)

- Mức ác tính của một VSV gây bệnh do các nhân tố ác tính sau:
 - + Độc tố (toxin)
 - + Tính xâm nhiễm (invasiveness)
 - + Kết hợp tính xâm nhiễm và độc tố
- *Clostridium tetani* không xâm nhiễm nhưng tạo ngoại độc tố
- *Streptococcus pneumoniae* gây bệnh nhờ khả năng tạo màng bao ngăn cản sự thực bào để tăng trưởng mạnh trong mô phổi
- *Samonella* Typhymurium, S. Typhi gây bệnh bằng cách kết hợp tính xâm nhiễm và độc tố:
 - + Ba loại độc tố: cytotoxin, endotoxin, enterotoxin
 - + Virulence factor tăng cường xâm nhập: polysaccharide O, flagellin, 10 protein Inv
 - + Virulence factor giúp sự tăng trưởng trong tế bào chủ: OxyR cảm ứng sự tổng hợp protein trung hòa độc tính O₂ của macrophage; PhoP, PhoQ trung hòa các kháng khuẩn defensin của macrophage; sidophore thu giữ Fe²⁺ cần cho tăng trưởng
 - + Virulence factor tăng cường sự lan nhiễm: các Spv mã hóa bởi plasmid

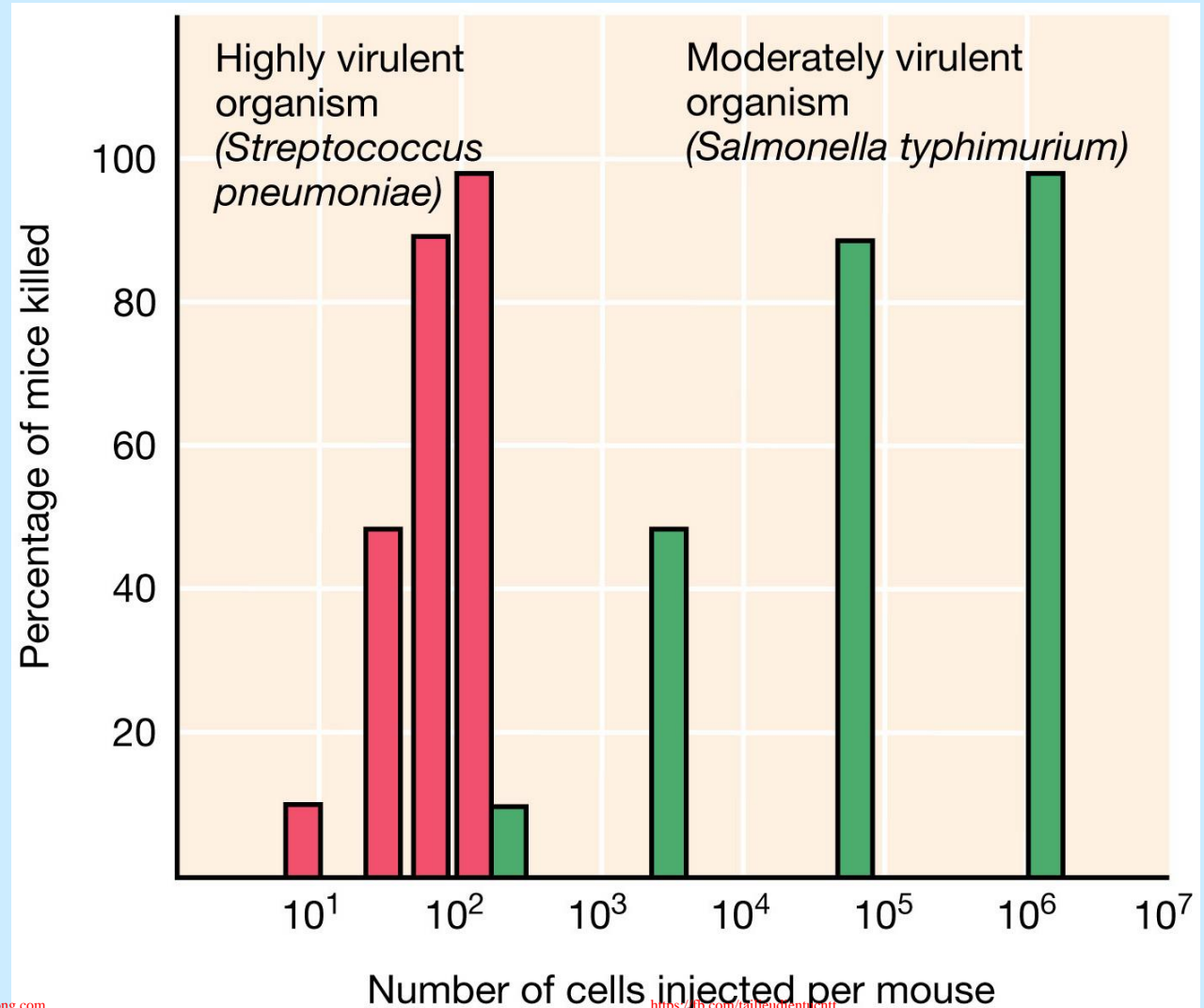


Định lượng mức ác tính

- Mức ác tính được định lượng thực nghiệm trên chuột:

+ Biểu thị bằng liều gây chết 50% LD_{50} (lethal dose): số tế bào cần để làm chết 50% quần thể động vật chủ (chuột) thử nghiệm

+ LD_{50} càng nhỏ thì tính gây bệnh càng cao và ngược lại



Hiện tượng nhược độc (attenuation)

- + VSV gây bệnh bị giảm hoặc mất tính gây bệnh khi được bảo quản lâu trong phòng thí nghiệm mà không cấy lên vật chủ
- + Các thể đột biến không gây bệnh có khả năng tăng trưởng tốt hơn và được chọn lọc qua các lần cấy chuyển
- + Chứng đột biến nhược độc thường được dùng làm vắc xin

Cơ chế phòng vệ không chuyên biệt của tế bào chủ

- Các đặc điểm về giải phẫu học, vật lý, hóa học ở vật chủ khỏe mạnh ngăn cản sự tạo khuẩn lạc và xâm nhập của ký sinh gây bệnh
- Viêm nhiễm và sốt: nhằm cô lập, phá hủy ký sinh gây bệnh hoặc phá hủy mô bệnh nhiễm
 - + Viêm nhiễm: đáp ứng tự vệ làm tăng lưu lượng máu, mang các thể thực bào đến vùng bị nhiễm; hình thành khối đông fibrin ngăn chặn sự lan nhiễm đến các bộ phận khác của cơ thể
 - + Sốt: do nội độc tố của vi khuẩn hoặc do chất gây sốt nội sinh từ thể thực bào, có tác dụng tăng tốc quá trình thực bào và đáp ứng của kháng thể
- Cơ chế phòng vệ chuyên biệt: đáp ứng miễn dịch

Miễn dịch không chuyên biệt do thực bào

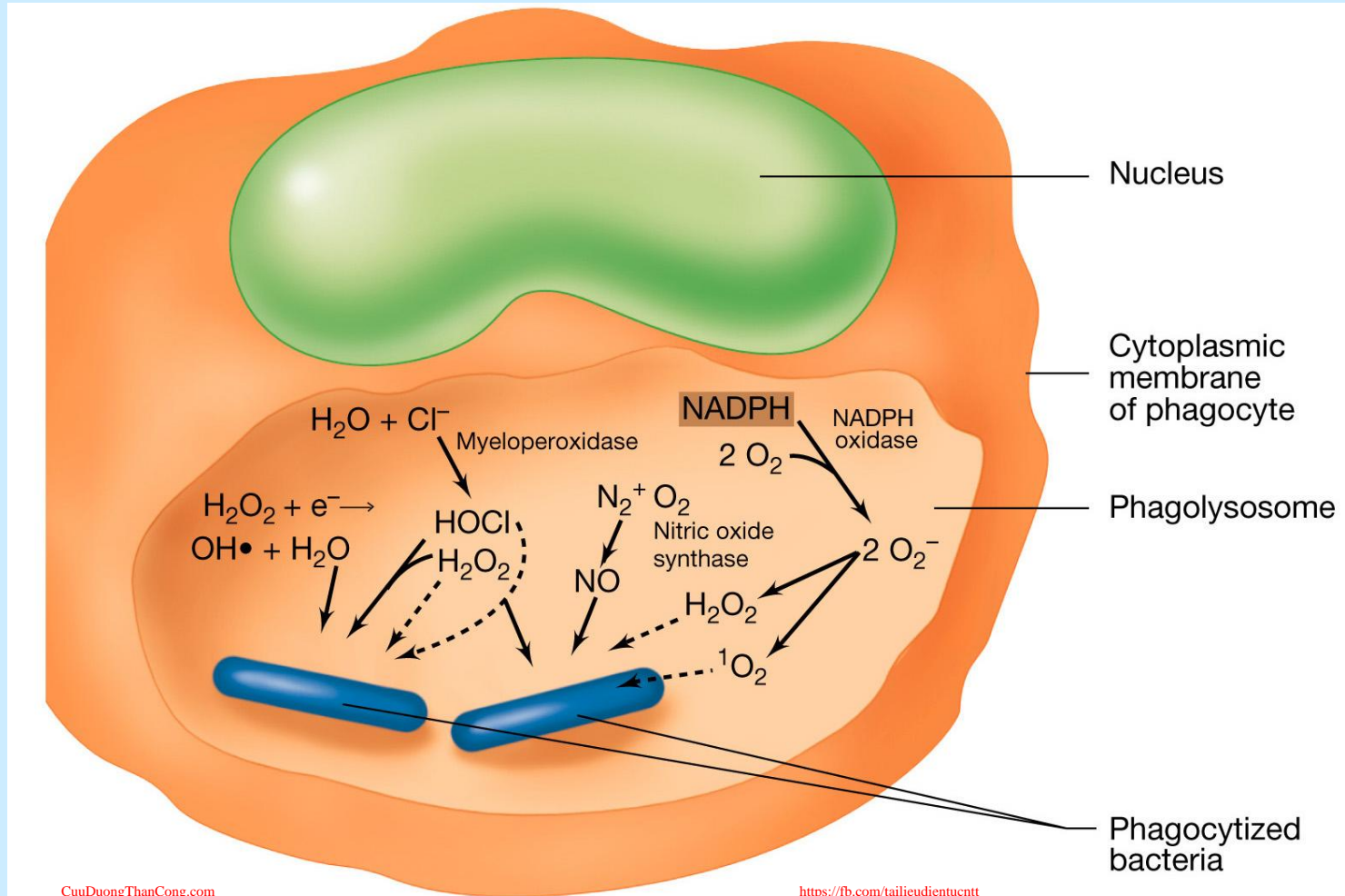
- **Thực bào (phagocyte) là tế bào đầu tiên của hệ miễn dịch tiếp xúc với VSV gây bệnh hoặc miễn dịch nguyên:**
 - + **Nuốt, thủy phân VSV, miễn dịch nguyên**
 - + **Trình diện kháng nguyên lên TCR**
- **Miễn dịch không chuyên biệt do thực bào:**
 - + **Thực bào di chuyển hướng hóa đến VSV gây bệnh nhờ tác dụng của esterase và protein hỗ trợ**
 - + **VSV được nuốt vào bên trong thực bào, dung hợp với lysosome của thực bào thành phagolysosome**
 - + **Thực bào chuyển từ hô hấp hiếu khí sang lên men bằng đường phân là hạ pH, tạo điều kiện tối ưu cho các thành phần của lysosome như H_2O_2 , lysozyme, protease, phosphatase, nuclease, lipase làm chết và tiêu hóa VSV**
- **Vai trò của các thực bào:**
 - + **PMN: di động tích cực, chứa nhiều lysosome, số lượng trong máu tăng mạnh khi bị nhiễm tác nhân lạ**
 - + **Bạch cầu đơn nhân: tiền thân của đại thực bào**
 - + **Đại thực bào: tế bào to, gắn vào bề mặt mô, thực hiện thực bào và trình diện kháng nguyên trong miễn dịch chuyên biệt**

Cơ chế tiêu diệt VSV gây bệnh của thực bào

- Thực bào tiêu diệt VSV gây bệnh trong phagolysosome bằng các phân tử oxygen có độc tính:
 - + Superoxide anion O_2^- được tạo ra bởi sự khử O_2 bằng NADPH oxidase
 - + Ở pH axit, O_2^- được chuyển thành H_2O_2 và ôxi đơn điện tử 1O_2 (singlet ôxi) có độc tính cao

+ H_2O và Cl^- được xúc tác bởi myelo - peroxidase thành $HOCl$, phân tử này phản ứng với H_2O_2 thành 1O_2

+ Thực bào ở một số động vật hữu nhũ còn tạo thành NO nhờ hoạt tính của nitric oxide synthase



Cơ chế trung hòa độc tính thực bào của VSV

- Carotenoid trung hòa độc tính ôxi ở *Staphylococcus aureus*
- Trung hòa độc tính ôxi bởi thành phần phenolic glycolipid trong vách tế bào ở *Mycobacterium tuberculosis*
- Tạo độc tố protein leukocidin tiêu diệt thực bào (*Streptococcus pyrogenes*, *Staphylococcus aureus*)
- Ngăn cản sự kết dính của thực bào lên bề mặt tế bào nhờ vỏ bao (*Streptococcus pneumoniae*)

Cơ sở miễn dịch học

Đáp ứng miễn dịch

- **Đáp ứng miễn dịch (immune response):** đáp ứng thích nghi của vật chủ nhằm kháng lại và tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh:
 - + Có tính chuyên biệt (specificity) đối với mỗi phân tử ngoại lai riêng biệt (kháng nguyên) từ tác nhân gây bệnh
 - + Có khả năng nhớ (memory) phân tử kháng nguyên: đáp ứng nhanh và mạnh đối với lần tiếp xúc tiếp theo với kháng nguyên
 - + Có khả năng chịu đựng (tolerance): không phản ứng với kháng nguyên của chính mình
- **Hai dạng đáp ứng miễn dịch:**
 - + **Miễn dịch tế bào (cellular immunity):** nhằm vào ký sinh gây bệnh và kháng nguyên của chúng hiện diện bên trên hoặc bên trong tế bào chủ
 - + **Miễn dịch dịch thể (humoral immunity):** đáp ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể, nhằm vào các ký sinh gây bệnh và các kháng nguyên nằm ngoài tế bào chủ

Cơ quan thuộc hệ thống miễn dịch

- **Máu:** hồng cầu (erythrocyte), bạch cầu (monocyte), tiểu cầu (platelets)
- **Bạch cầu:**
 - + Bạch cầu đơn nhân (monocyte), đại thực bào (macrophage) và bạch cầu đa nhân (polymorphonuclear, PMN) có vai trò thực bào
 - + Bạch huyết bào (lympho bào, lymphocyte) tham gia tạo kháng thể và miễn dịch tế bào
- **Lymph:** dịch lympho, là máu đã loại bỏ hồng cầu
- **Plasma:** huyết tương, là máu đã loại bỏ các tế bào máu
- **Serum:** huyết thanh, là dịch còn lại sau khi fibrinogen của huyết tương bị kết đông
- Các bạch huyết bào ra khỏi mạch máu ngoại vi tại các mô, đi vào các mao mạch lympho, các hạch bạch huyết (lymph node) của hệ bạch huyết (lymphatic system), tại đây vi sinh vật và kháng nguyên được lọc
- Hạch bạch huyết và lách (spleen) là hai nơi quan trọng nhất trong đáp ứng miễn dịch

Tế bào thuộc hệ thống miễn dịch

- Mọi tế bào tham gia hệ miễn dịch đều có nguồn gốc từ tế bào gốc (tế bào mầm, stem cell) trong tủy xương
- Tế bào mầm phân hóa thành các tế bào máu dưới tác dụng của các bào tố (cytokine) theo hai hướng:
 - + Tiên bào tủy (myeloid precursor): tiếp tục phân hóa thành bạch cầu đơn nhân (trưởng thành thành đại thực bào), dưỡng bào (mast cell), bạch cầu đa nhân (PMN) và tiểu cầu (platelet)
 - + Tiên bào lympho (lymphoid precursor): trưởng thành trong tủy xương thành lympho bào B hoặc trong tuyến ức thành lympho bào T
- Các bạch cầu, lympho bào (bạch huyết bào) tham gia vào đáp ứng miễn dịch

Sự phân hóa và vai trò của bạch huyết bào B

- Bạch huyết bào B:

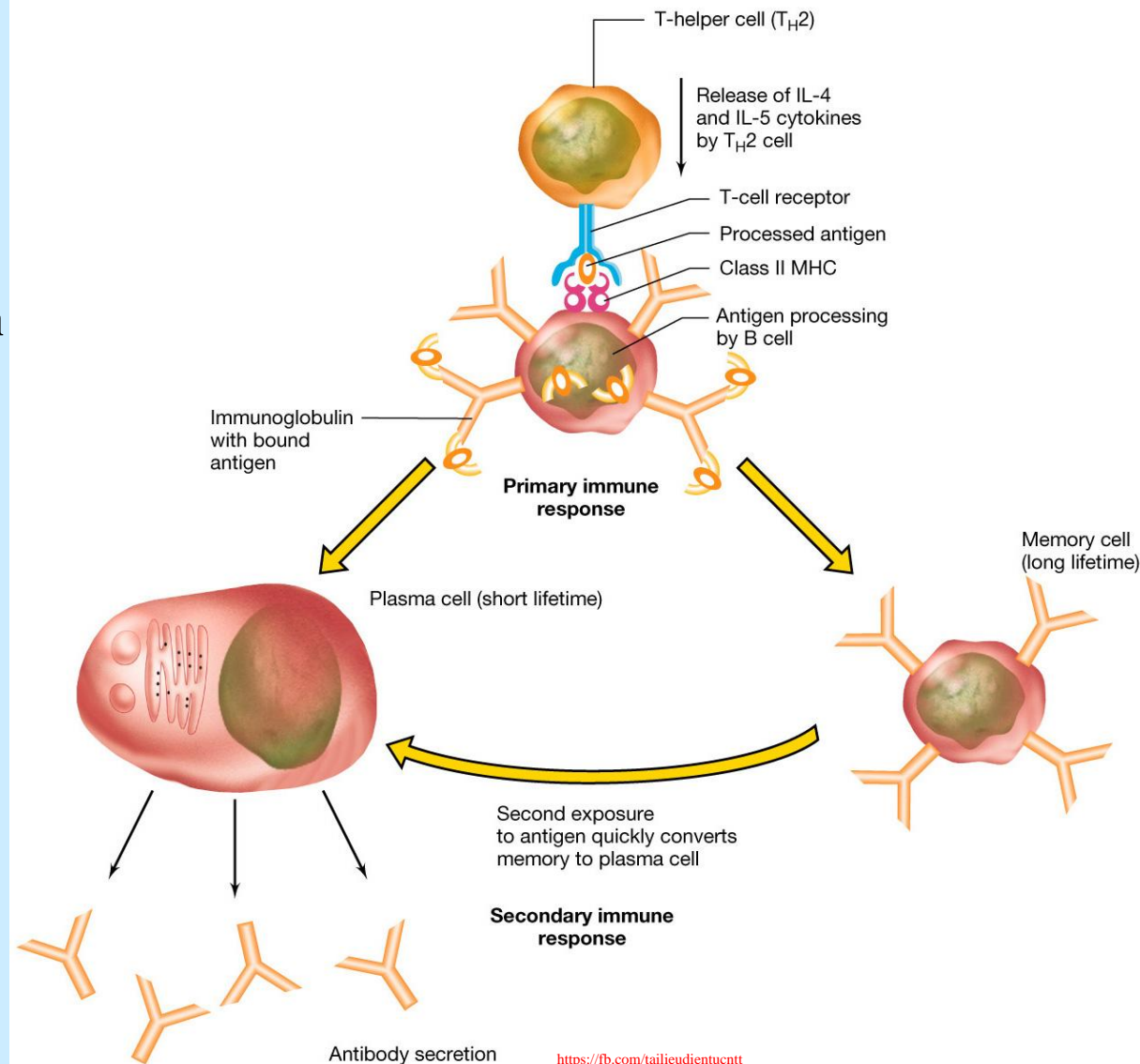
- + Gồm tương bào (plasma cell) và tế bào nhớ (memory cell)
- + Tương tác với kháng nguyên, sản xuất kháng thể và sự nhớ miễn dịch

+ Có sự hiện diện của kháng thể (do tế bào sản xuất) trên bề mặt tế bào, gọi là thụ thể kháng nguyên (immunoglobulin antigen receptor)

+ Nhận diện kháng nguyên ở cấu hình tự nhiên trên bề mặt tế bào vì sinh vật gây bệnh

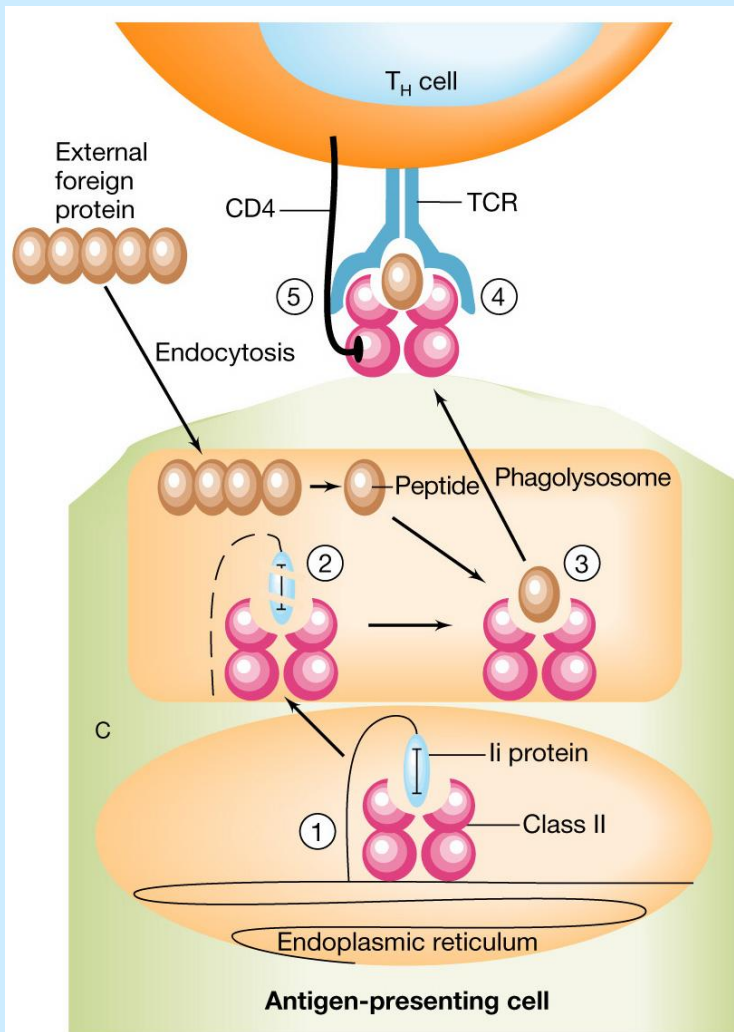
- Tương bào sản xuất kháng thể, nhưng chỉ tồn tại vài ngày

- Tế bào nhớ tồn tại vài năm, khi được tiếp xúc trở lại với kháng nguyên, phân chia nhanh chóng thành nhiều tế bào nhớ và nhiều tương bào

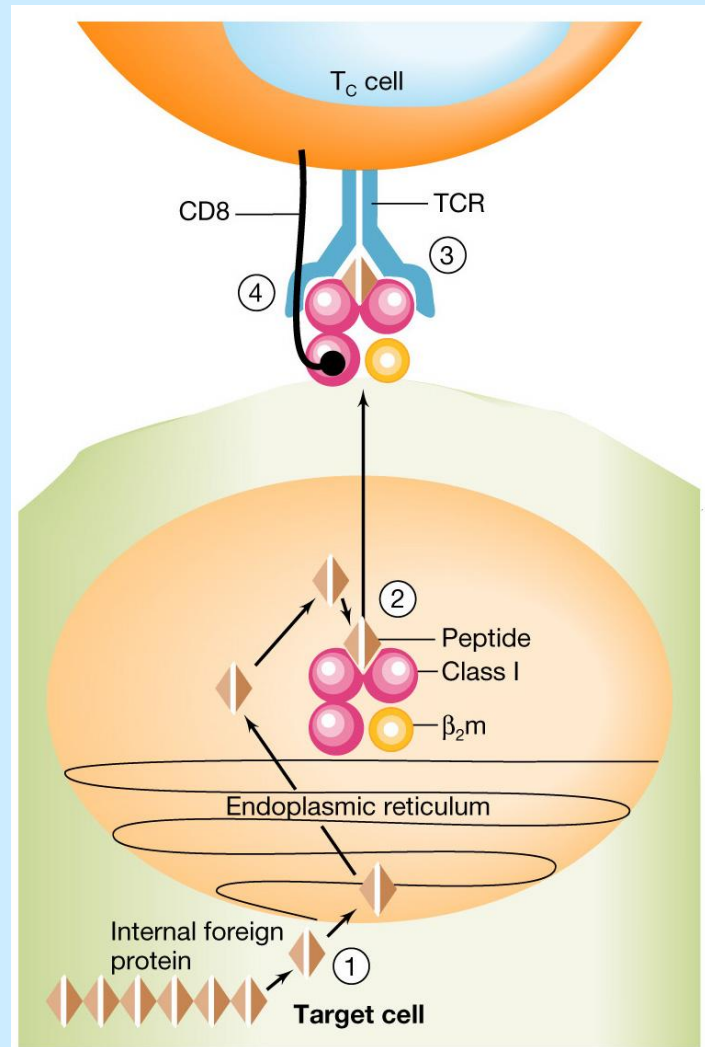


Các thành phần của hệ thống miễn dịch trên bề mặt bạch huyết bào T

- Thụ thể TCR: nhận diện và gắn kháng nguyên (được trình diện)
- Protein CD4 và CD8 giúp nhận diện MHC



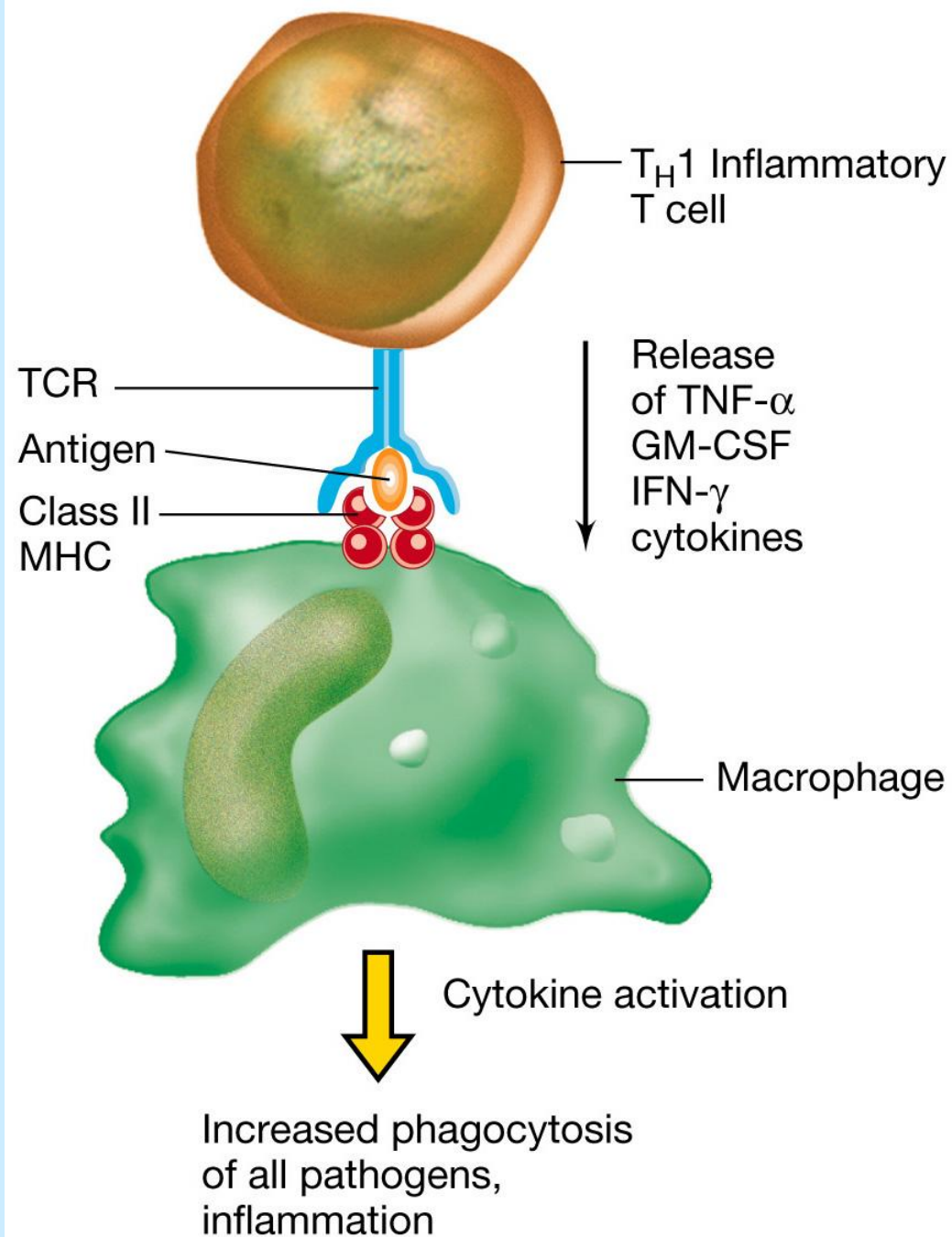
(b)



(a)

Sự phân hóa và vai trò của bạch huyết bào T

- Bạch huyết bào T phân hóa trong tuyến ức thành: Tế bào CD4 và Tế bào CD8
- Tế bào CD4: chứa CD4 và TCR gồm hai loại:
 - + Viêm bào T_H1 (T inflammatory cell) hoạt hóa thực bào
 - + Trợ bào T_H2 (T helper 2 cell) kích thích bạch huyết bào B bào tạo kháng thể số lượng lớn
- Tế bào CD8: chứa CD8 và TCR, gồm 1 loại:
 - + Độc bào T_c (T cytotoxic cell) tiêu diệt trực tiếp và chuyên biệt các tế bào đích mang kháng nguyên

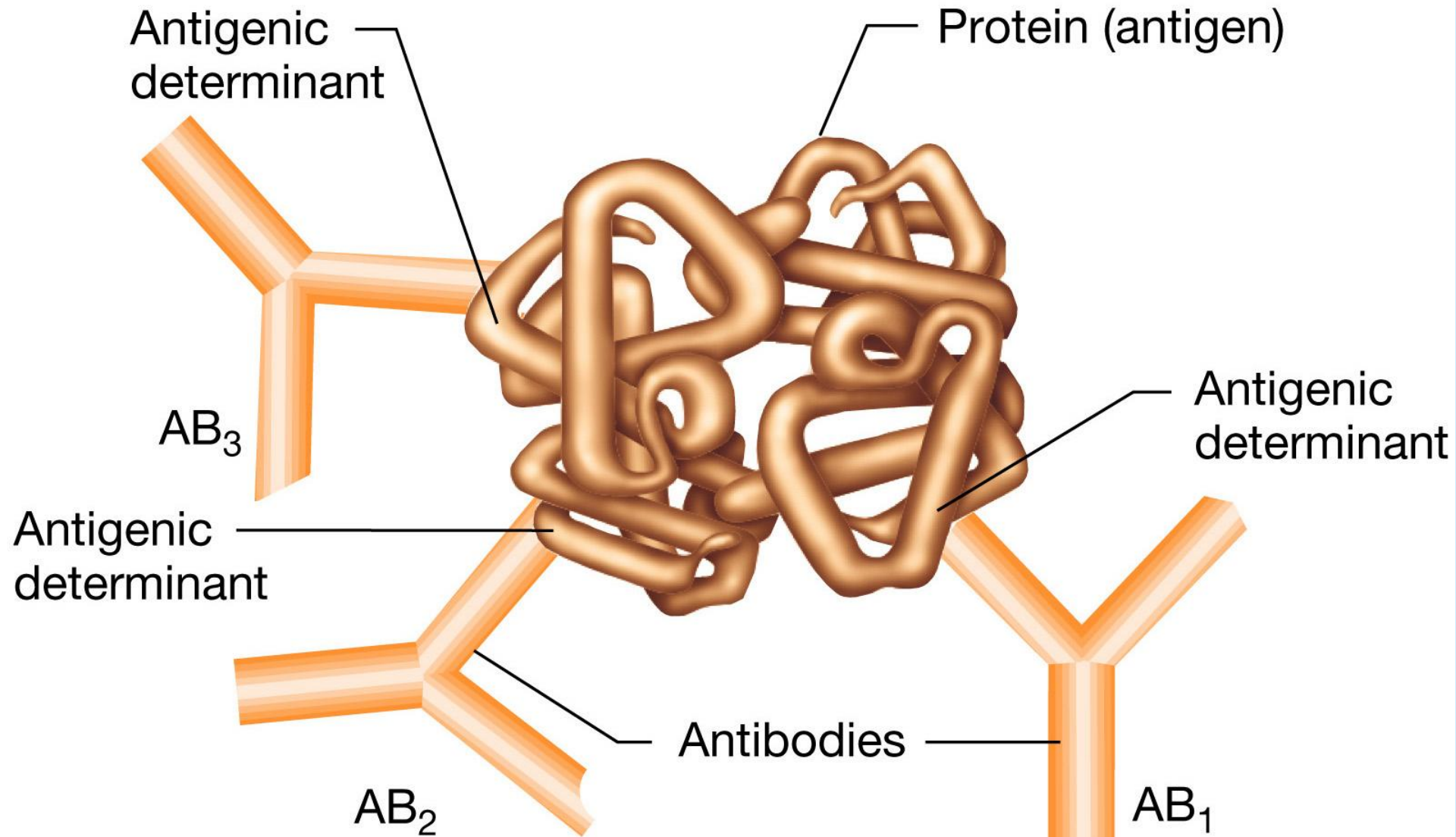


(b)

Miễn dịch nguyên và kháng nguyên

- **Miễn dịch nguyên (immunogen):** phân tử có kích thước đủ lớn, đủ phức tạp có thể gây ra một đáp ứng miễn dịch ở động vật (protein, lipoprotein, polysaccharide, nucleic acid)
- **Kháng nguyên (antigen):** phân tử có thể tương tác với các thành phần của hệ thống miễn dịch như:
 - + Kháng thể
 - + Thụ thể chuyên biệt kháng nguyên (antigen-specific receptor) hay thụ thể tế bào T (T cell receptor, TCR) trên bề mặt tế bào T
 - + Protein tương hợp mô MHC
- Phần lớn kháng nguyên là miễn dịch nguyên (immunogen), trừ một số chất có phân tử lượng nhỏ có thể gắn với kháng thể chuyên biệt nhưng không gây đáp ứng miễn dịch
- **Yếu tố xác định kháng nguyên (antigenic determinant, epitope):** phân đoạn 4 - 6 amino acid trên protein, chất có phân tử lượng nhỏ trên immunogen tham gia tương tác trực tiếp với kháng thể, TCR, MHC
- **Epitope lập thể (conformational determinant, epitope):** epitope có thể được hình thành từ amino acid ở cách xa nhau trên cấu trúc bậc 1 nhưng nằm gần nhau trong cấu hình tự nhiên của protein
- Một immunogen có thể chứa nhiều epitope khác nhau
- Phần tương tác với epitope trên kháng thể được gọi là paratope

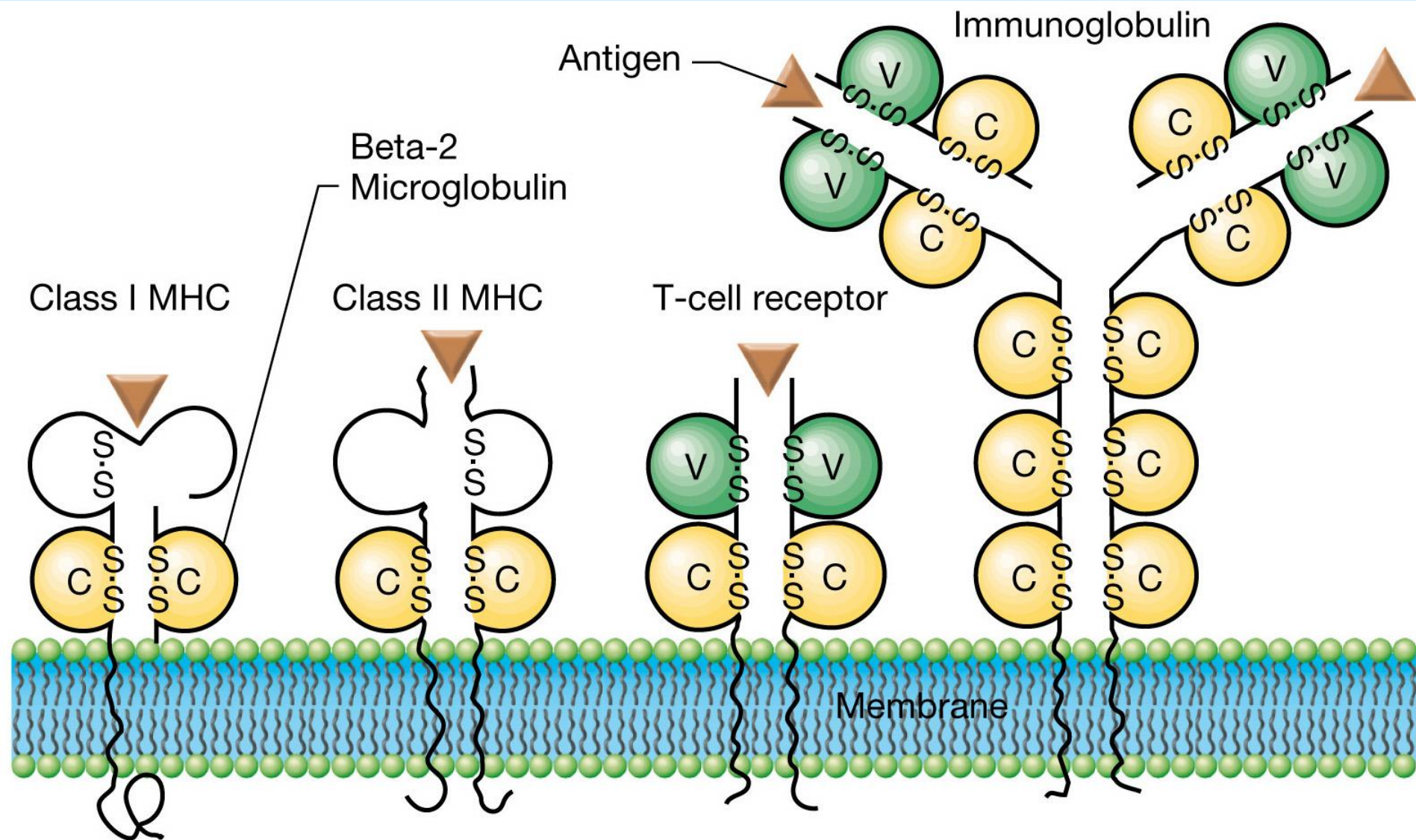
Kháng nguyên – Epitope - Kháng thể



Các phân tử của hệ thống miễn dịch nhận diện và gắn kháng nguyên

- **Kháng thể:**
 - + Nhận diện kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch chính nó (đồng kháng nguyên, homologous antigen) và một vài kháng nguyên khác (dị kháng nguyên, heterologous antigen)
 - + Tương tác giữa kháng thể với di kháng nguyên gọi là phản ứng chéo (cross reaction)
- **TCR chỉ nhận diện epitope của miễn dịch nguyên đã bị phân hủy và được trình diện trên tế bào APC (antigen-presenting cell) hoặc tế bào mục tiêu (TCR chỉ nhận diện epitope có cấu trúc bậc I, không nhận diện epitope lập thể)**
- **MHC (protein tương hợp mô) vừa nhận diện epitope vừa nhận diện TCR**

Các phân tử tương tác với kháng nguyên

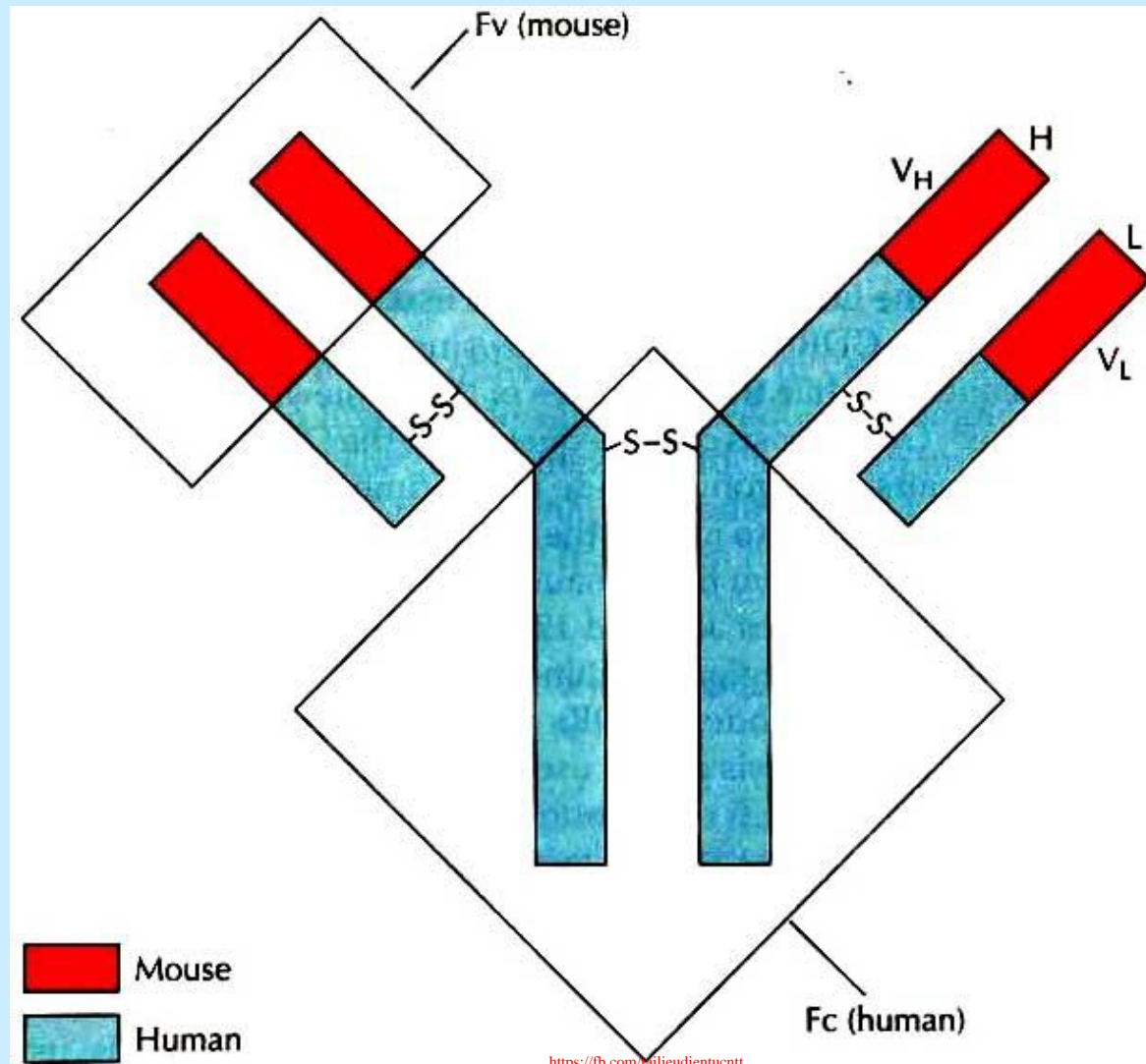


Kháng thể

- Kháng thể (antibody, immunoglobulin Ig): IgM, IgG, IgA, IgD và IgE
- IgM: chiếm 10% Ig, dạng phức hợp 5 phân tử kháng thể có 10 vị trí gắn kháng nguyên, được tạo ra trước tiên khi có một đáp ứng với một kháng nguyên
- IgG chiếm 80% Ig, 4 phân nhóm IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 và IgG_4
- IgA: kháng thể hiện diện trong các dịch hoặc chất tiết
- IgE: khởi sự các phản ứng dị ứng
- IgD: chức năng chưa rõ, hiện diện trên bề mặt tế bào B, cùng phối hợp với IgM để gắn kháng nguyên vào tế bào B

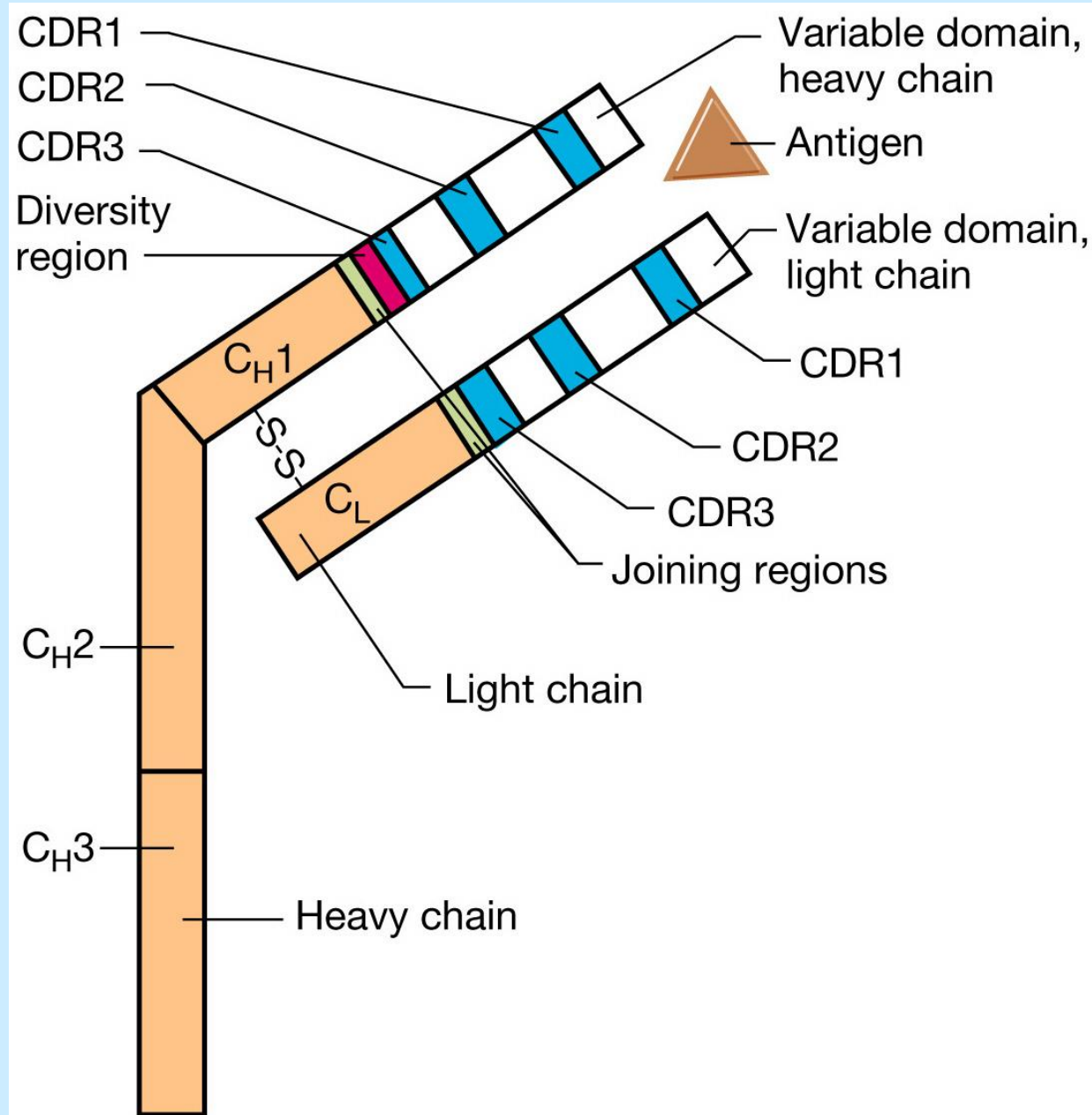
Cấu trúc kháng thể IgG

- Cấu trúc: hai chuỗi nhẹ (light chain) và hai chuỗi nặng (heavy chain)
- Sợi nhẹ có 2 và sợi nặng có 4 cầu nối disulfide bên trong phân tử tạo cấu trúc bậc 3
- Thủy phân bằng papain tạo 2 đoạn Fab và 1 đoạn Fc
 - + Đoạn Fab chứa vùng biến đổi và một phần của vùng ổn định, không có tính miễn dịch nguyên
 - + Đoạn Fc chứa phần còn lại của vùng ổn định, có tính miễn dịch nguyên



Cấu trúc kháng thể IgG

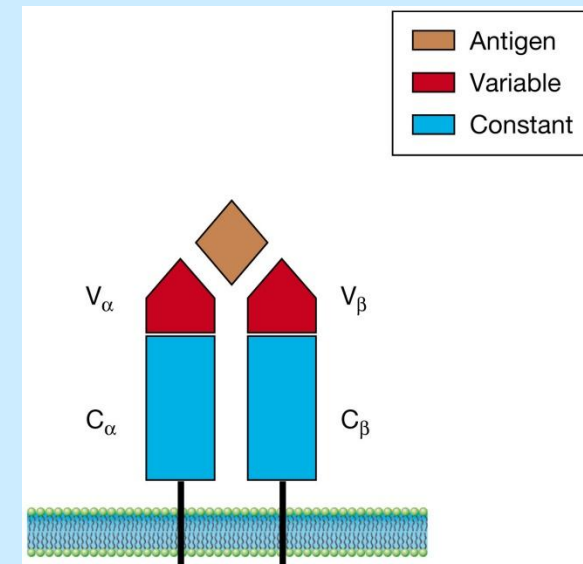
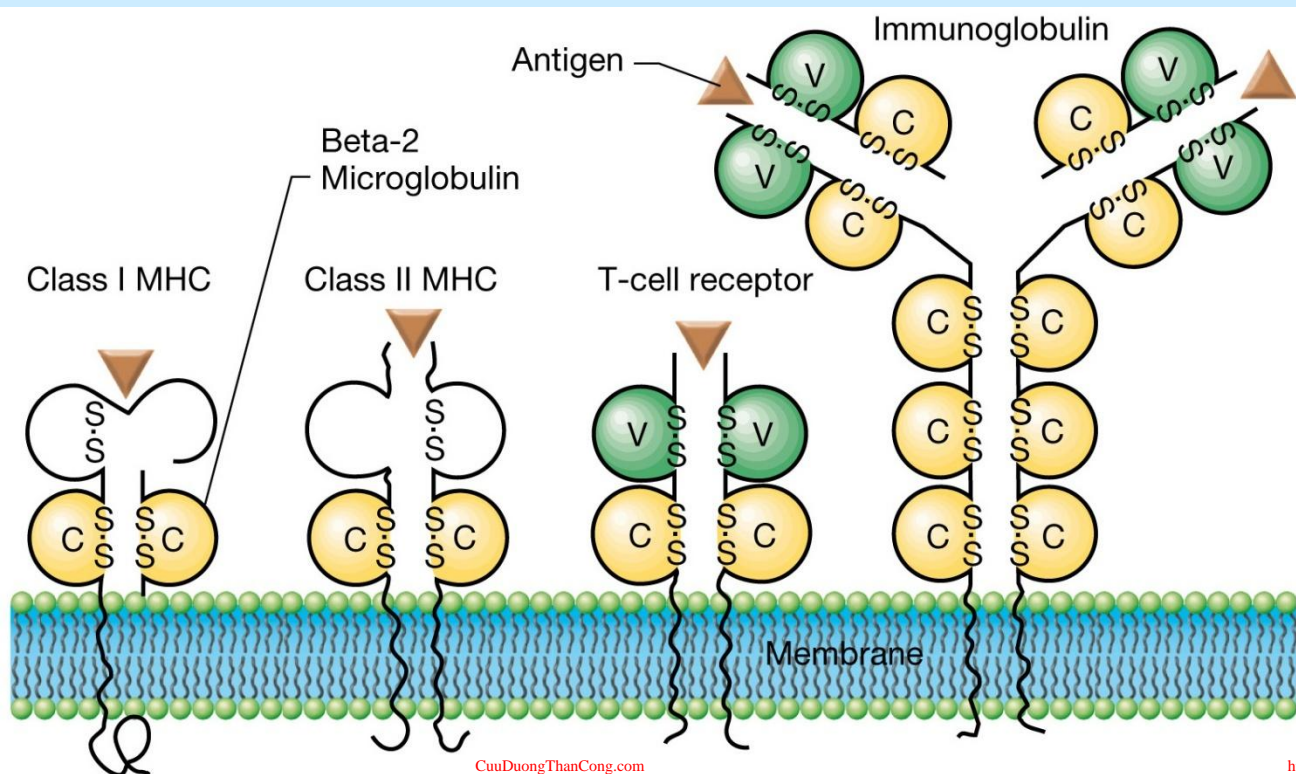
Đầu N chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa 3 vùng thay đổi (variable region, complementarity determining region, CDR) là nơi gắn chuyên biệt epitope của kháng nguyên



(a)

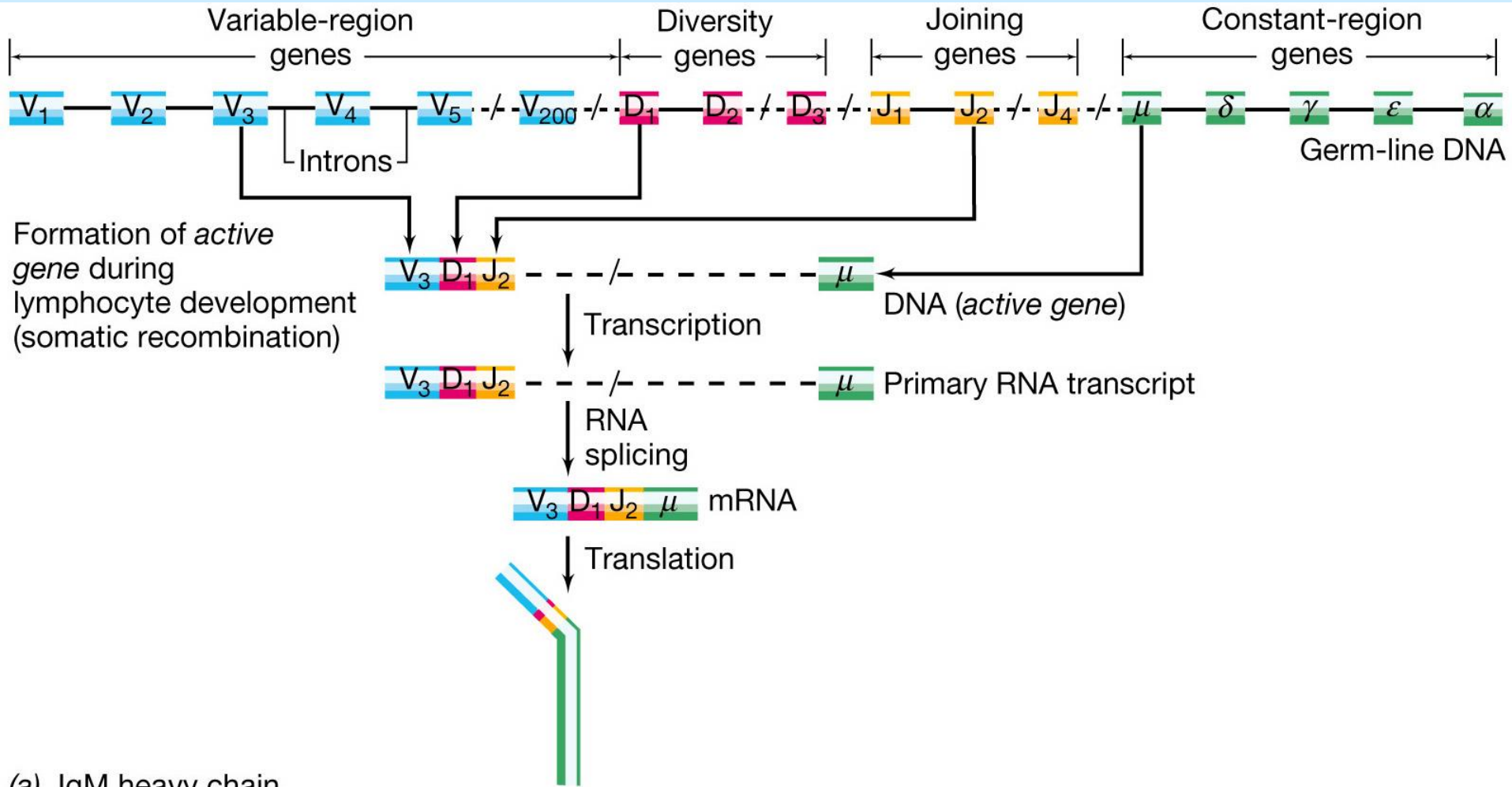
Thụ thể tế bào T (TCR)

- Tế bào T không sản xuất kháng thể nhưng có thể nhận diện chuyên biệt kháng nguyên thông qua TCR trên bề mặt tế bào
- Cấu trúc của TCR:
 - + Peptide α (40kDa) và β (43kDa), mỗi sợi gắn vào màng, có vùng thay đổi ở đầu N và vùng ổn định ở đầu C
 - + Mỗi sợi có hai cầu disulfide tạo cấu trúc bậc ba
 - + Cấu trúc tương đồng với kháng thể nhưng chỉ nhận diện được kháng nguyên đã được trình diện bởi protein tương hợp mô

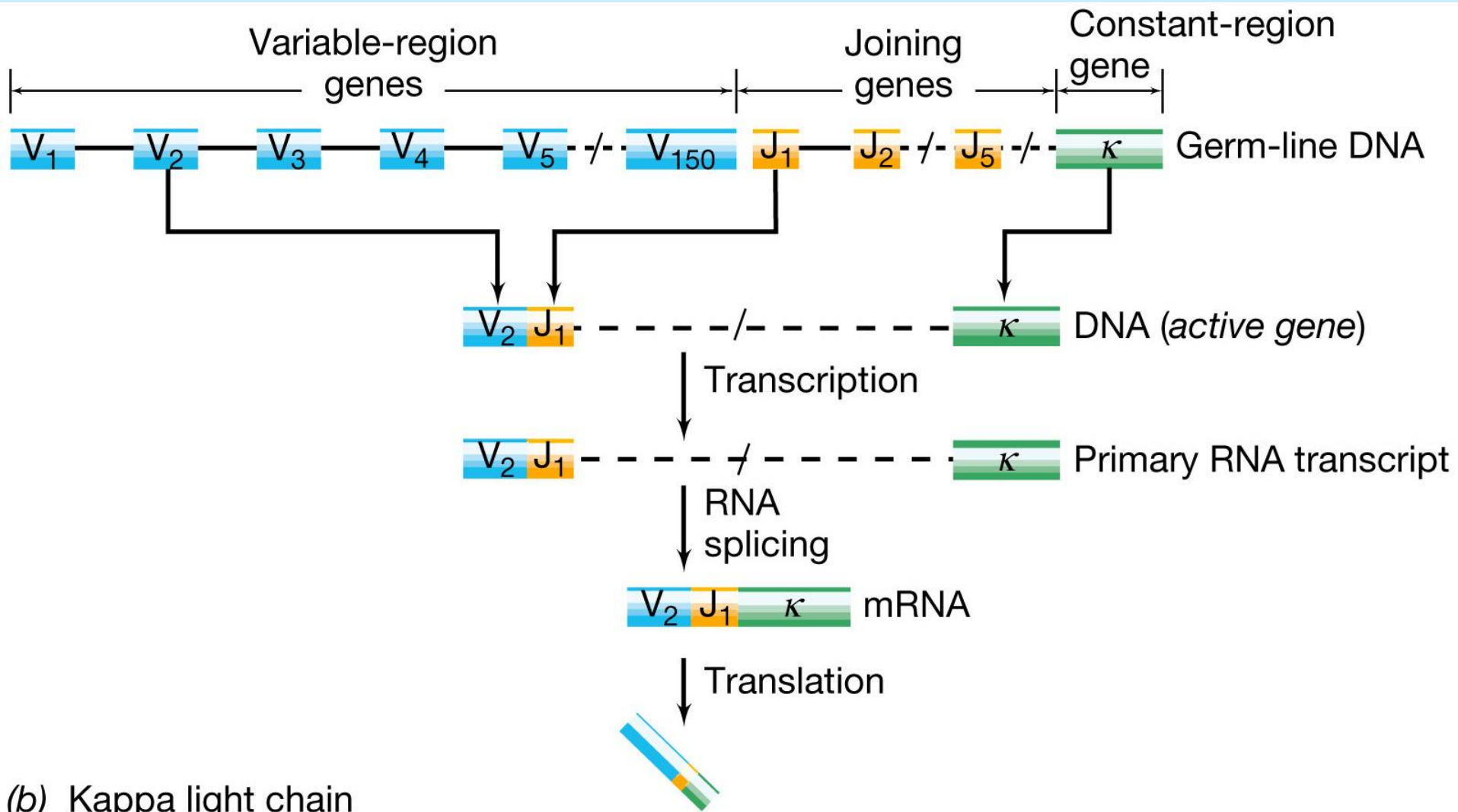


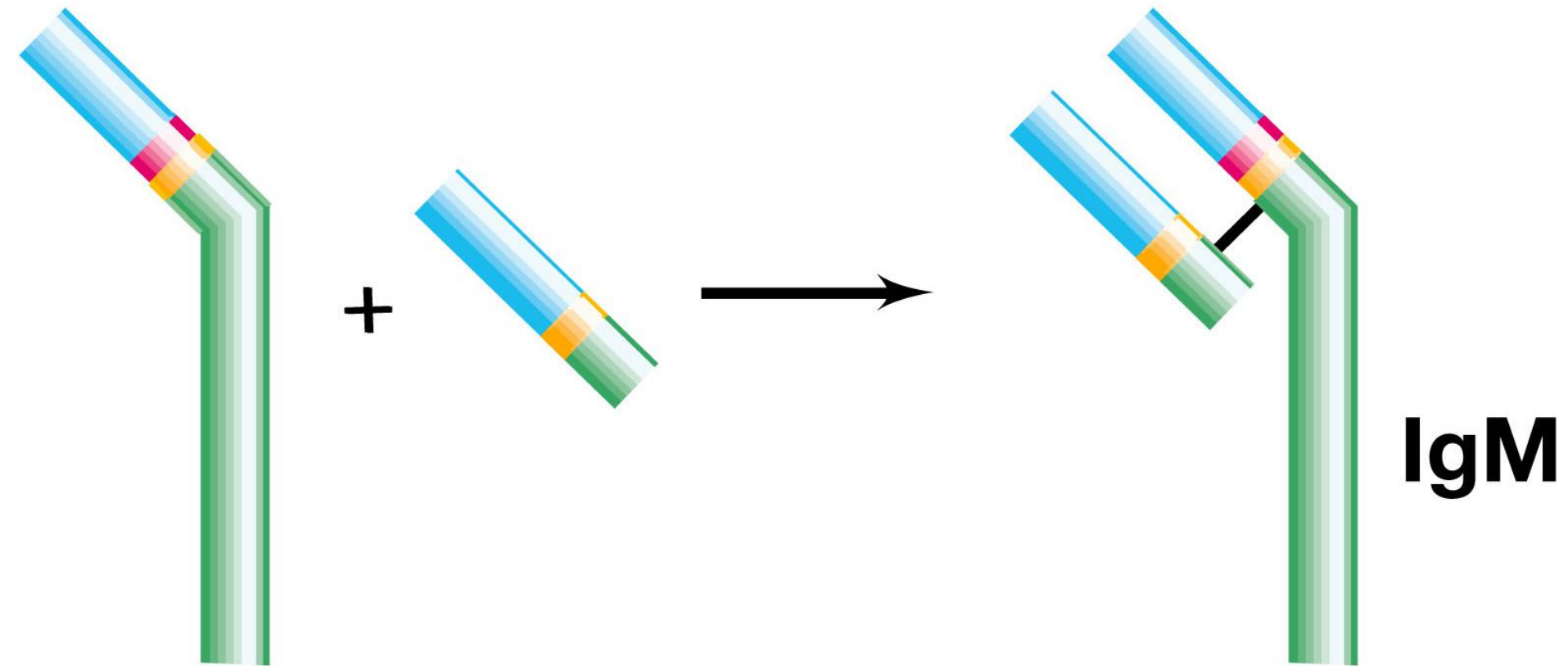
Tính đa dạng của kháng thể, TCR

- **Thuyết gen phân đoạn (genes in pieces):**
 - + **Mỗi polypeptide của kháng thể, TCR được mã hóa bởi vài gen, hình thành một tổ hợp khoảng 400 gen**
 - + **Trong quá trình phát triển của tế bào B, T, có sự sắp xếp lại (tái tổ hợp, loại bỏ các intron) các gen này thành một gen hoạt động**
 - + **Có thể tạo ra số lượng vô hạn gen hoạt động từ 400 gen ban đầu**



(a) IgM heavy chain





(c) Sum of A and B

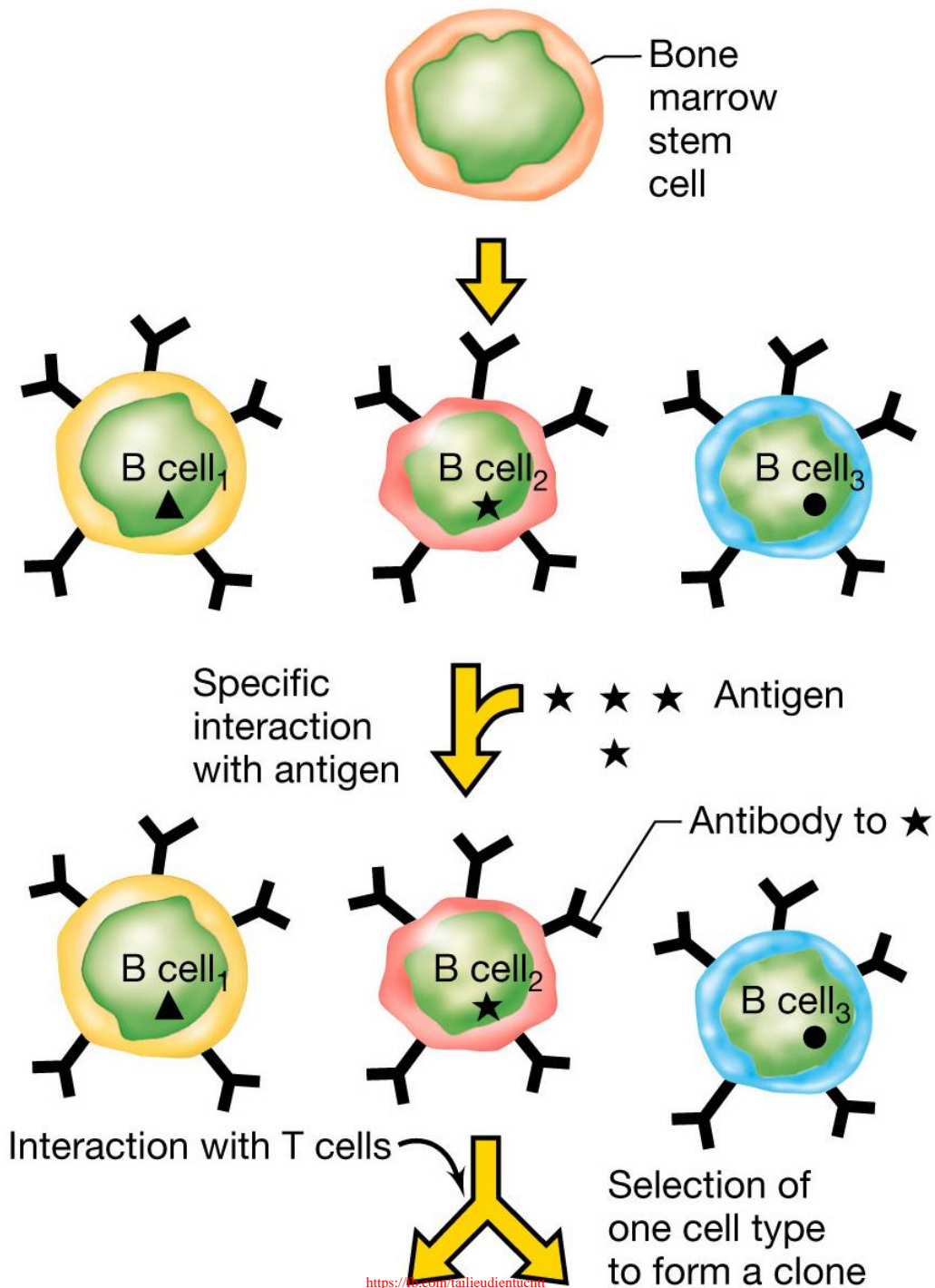
Chọn lọc dòng

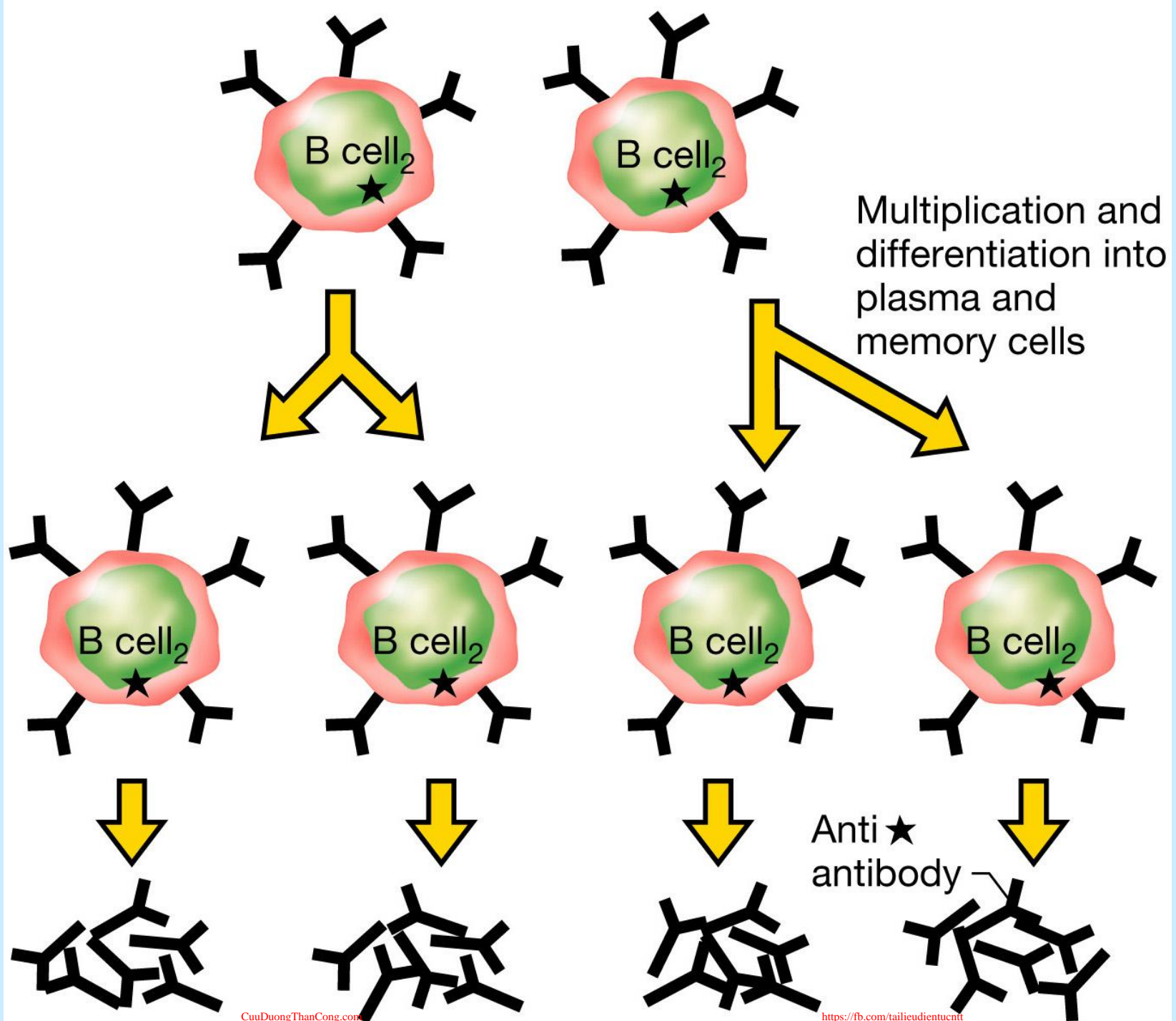
- Thuyết chọn lọc dòng (clonal selection theory):

+ Mỗi tế bào B hoặc T chỉ mang một loại thụ thể chuyên biệt với một kháng nguyên nhất định trên bề mặt

+ Khi được hoạt hóa do sự gắn kháng nguyên vào thụ thể, tế bào B và T phân chia và gia tăng nhanh thành dòng

+ Các dòng tế bào B và T được hoạt hóa bởi kháng nguyên của chính tế bào sẽ bị bất hoạt hoặc đào thải bởi cơ chế chịu miễn dịch (vai trò của protein tương hợp mô)





Protein tương hợp mô MHC

- Protein tương hợp mô (major histocompatibility protein): MHC
 - + Họ protein hiện diện trên các tế bào bình thường của vật chủ
 - + Được mã hóa bởi một vùng gen phức hợp tương hợp mô chính (major histocompatibility complex, *mhc*)
 - + Ở người MHC còn được gọi là kháng nguyên bạch cầu người HLA (human leucocyte antigen)
- Có vài trăm gen *mhc* khác nhau ở người, MHC ở các cá thể khác nhau có thể khác nhau
- Chức năng MHC:
 - + Gắn với TCR để nhận diện tế bào của cơ thể
 - + Gắn với kháng nguyên để trình diện kháng nguyên cho tế bào T

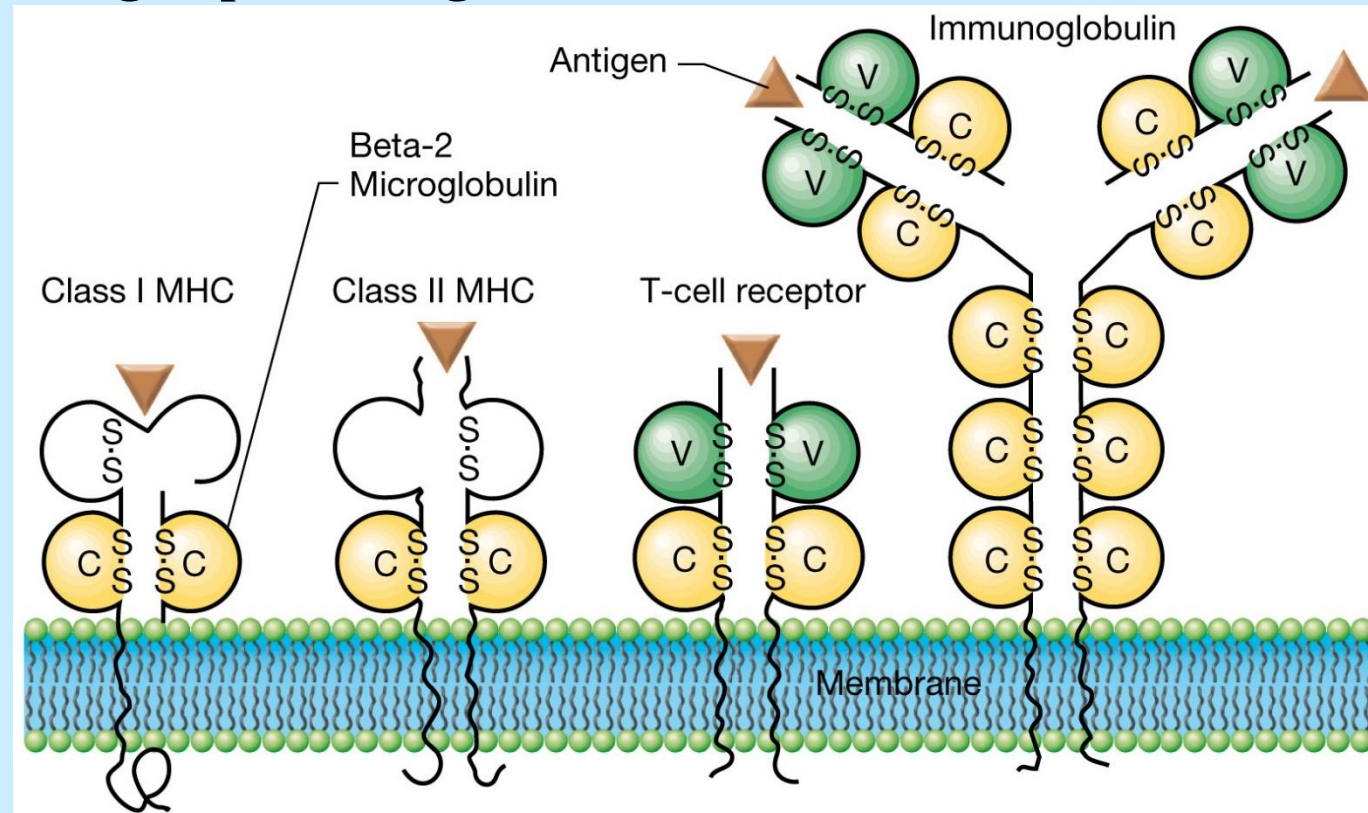
MHC I và MHC II

- MHC nhóm I:

- + Hiện diện trên tất cả tế bào có nhân trong động vật
- + Gồm hai sợi polypeptide là α (42kDa) và β_2m (12kDa, β_2 microglobulin) nối với nhau bằng liên kết không cộng hóa trị

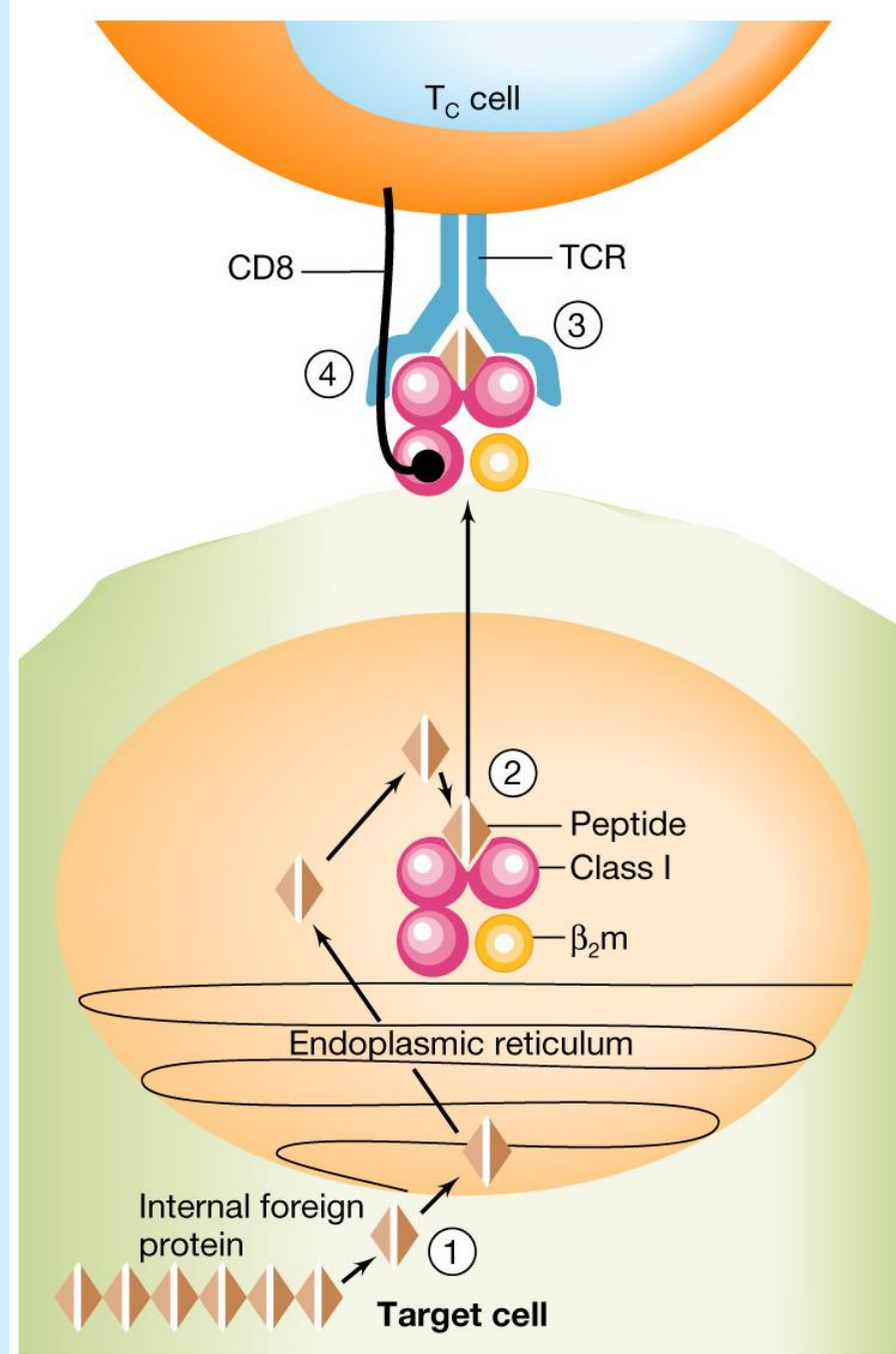
- MHC nhóm II:

- + Hiện diện trên bề mặt tế bào B, trên đại thực bào và các tế bào trình diện kháng nguyên APC (antigen-presenting cell)
- + Gồm hai sợi α (33kDa) và β (28kDa) nối với nhau bằng liên kết không cộng hóa trị



Cơ chế trình diện của MHC I

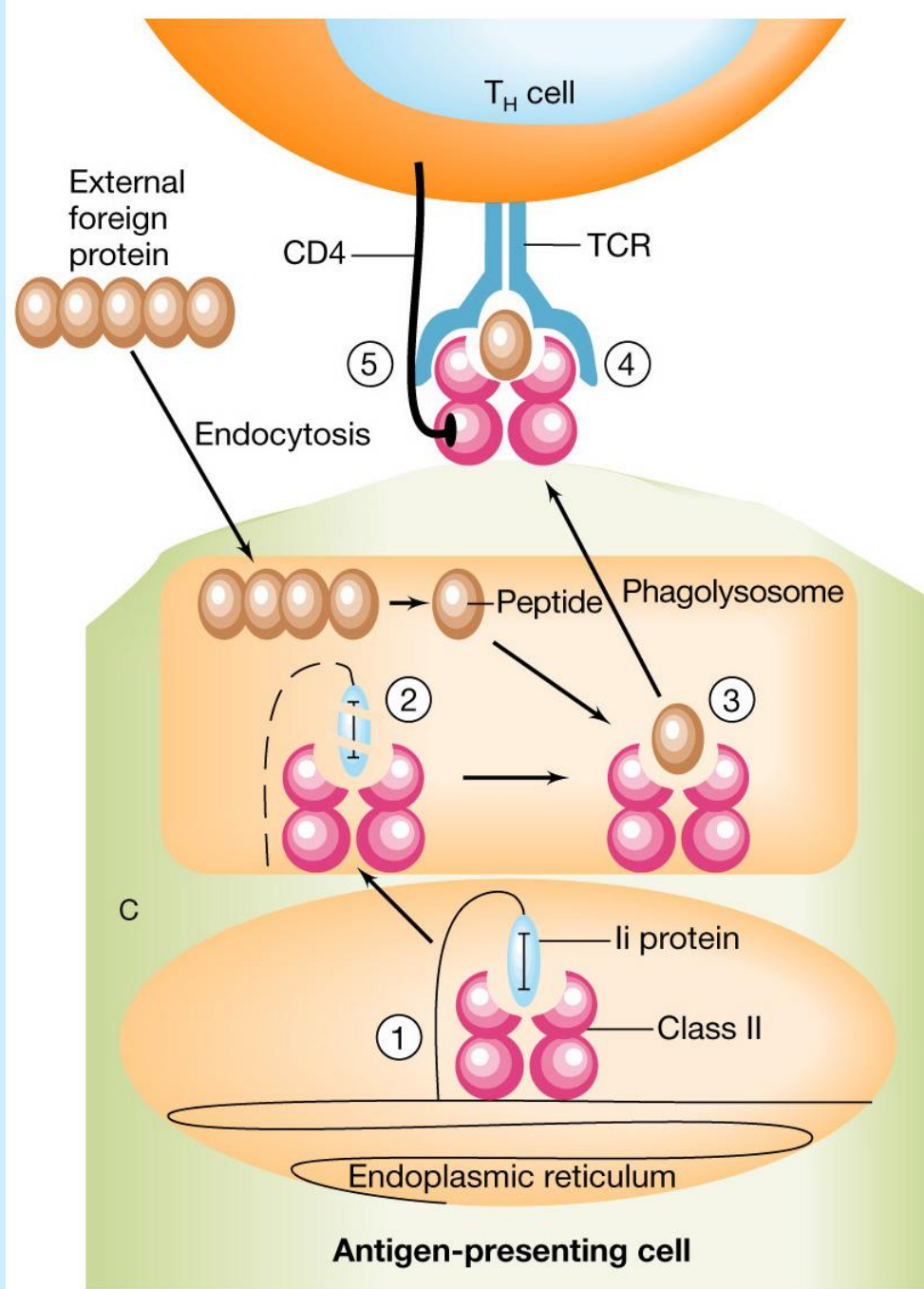
- Trong tế bào chủ (không là tế bào máu) bị nhiễm ký sinh gây bệnh, VSV bị thủy phân thành kháng nguyên
- Kháng nguyên (khoảng 10 amino acid) gắn với MHC I tại lưới nội chất (endoplasmic reticulum) và được chuyển lên bề mặt tế bào
- Kháng nguyên gắn với tế bào T_C thông qua TCR, cảm ứng T_C tạo độc tố perforin tiêu diệt tế bào nhiễm



(a)

Cơ chế trình diện của MHC II

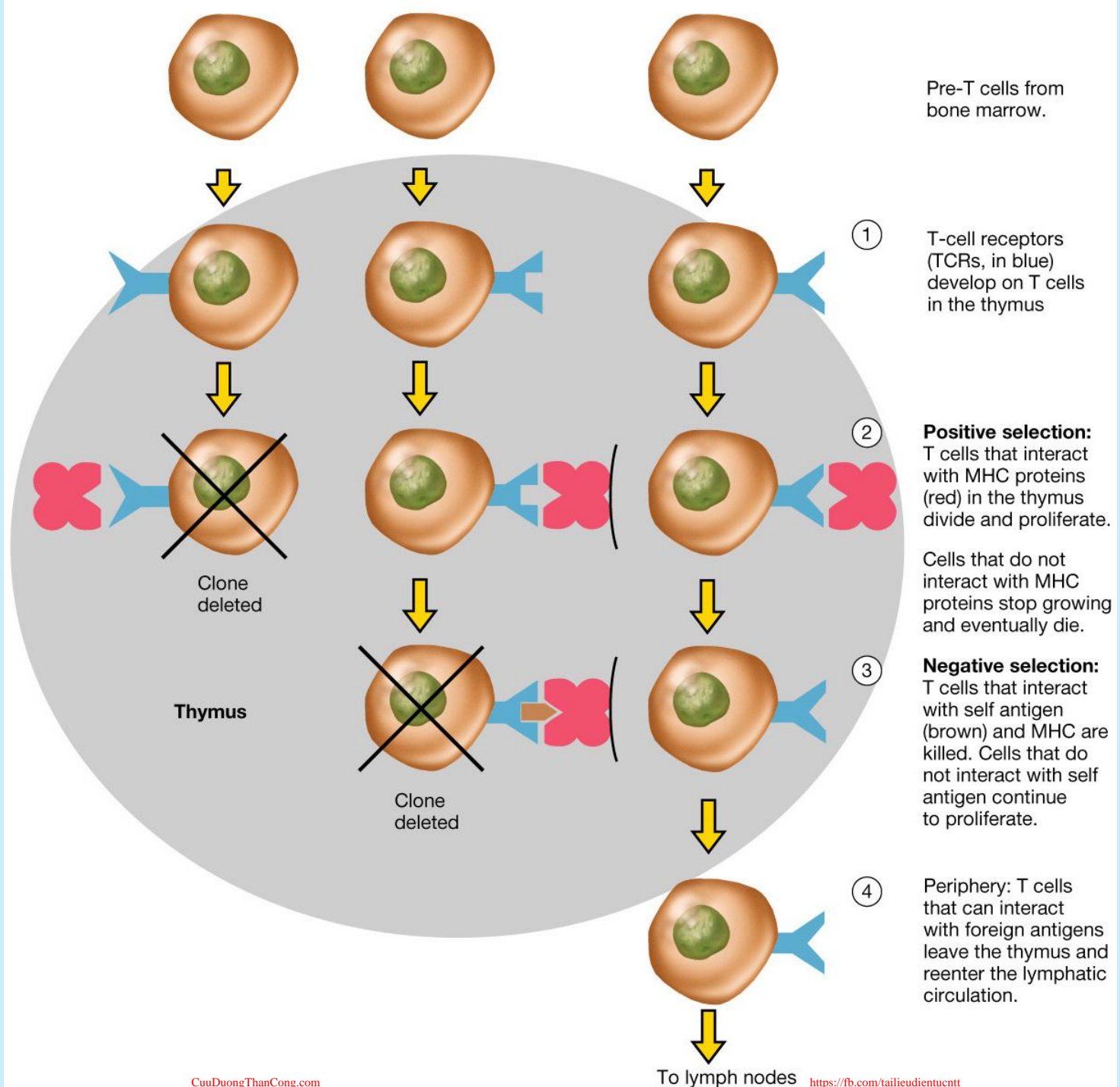
- Liên quan đến các tế bào trình diện kháng nguyên APC
- MHC II được tạo trong lưới nội chất và bị khóa bởi protein Ii và vào lysosome
- APC nuốt các miễn dịch nguyên, hình thành phagolysosome, thủy phân miễn dịch nguyên thành kháng nguyên khoảng 11 – 15 amino acid, đồng thời thủy phân protein Ii trong MHC II
- Kháng nguyên được gắn vào MHC và được chuyển lên bề mặt tế bào để gắn vào tế bào T_H thông qua TCR
- T_H2 sẽ được hoạt hóa, tổng hợp và tiết ra bào tố kích thích tế bào B tăng cường sản xuất kháng thể



(b)

Tính chịu miễn dịch

- Tính chịu miễn dịch (immune tolerance) ở tế bào T: cơ chế đào thải dòng (clonal deletion) diễn ra ở tuyến ức
 - + Chọn lọc dương (positive selection): TCR của các tế bào T tương tác với MHC ở tuyến ức; tế bào nào không gắn được với MHC thì bị đào thải, tế bào gắn được thì tăng trưởng
 - + Chọn lọc âm (negative selection): các tế bào T đã chọn lọc dương tương tác với MHC trình diện kháng nguyên của tế bào tuyến ức, tế bào nào gắn được sẽ được giữ lại tuyến ức và bị chết; tế bào không gắn sẽ ra khỏi tuyến ức
 - + Kết quả của 2 chọn lọc: tế bào T có thể nhận diện kháng nguyên của chính ký chủ sẽ bị đào thải
- Quá trình hình thành tính chịu miễn dịch cũng xảy ra với tế bào B



Bào tố

- Bào tố (cytokine, lymphokine): các protein do bạch huyết bào tiết ra để giao tiếp và điều hòa hoạt động của các tế bào của hệ thống miễn dịch
- Bào tố tiết ra bởi một tế bào sẽ được gắn lên thụ thể của một tế bào khác hay gắn lên thụ thể của chính nó
- Sự gắn của bào tố lên thụ thể sẽ điều hòa các hoạt động sinh tổng hợp và phân chia của tế bào, dẫn đến sự phân hóa và sự gia tăng nhanh chóng của dòng bạch huyết bào
- Interleukine IL: IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12
- Các cytokine khác:
 - + IFN- α , IFN- β : do bạch cầu tiết ra, ức chế sự nhân bản của virút trong tất cả tế bào
 - + TNF- α , TNF- β : do tế bào T tiết ra, phân hủy nhiều loại tế bào ung thư
- Chemokine: các bào tố có tác dụng thu hút thực bào và tế bào T đến chỗ bị nhiễm bị thương, gây đáp ứng miễn dịch và gây viêm

Interleukine

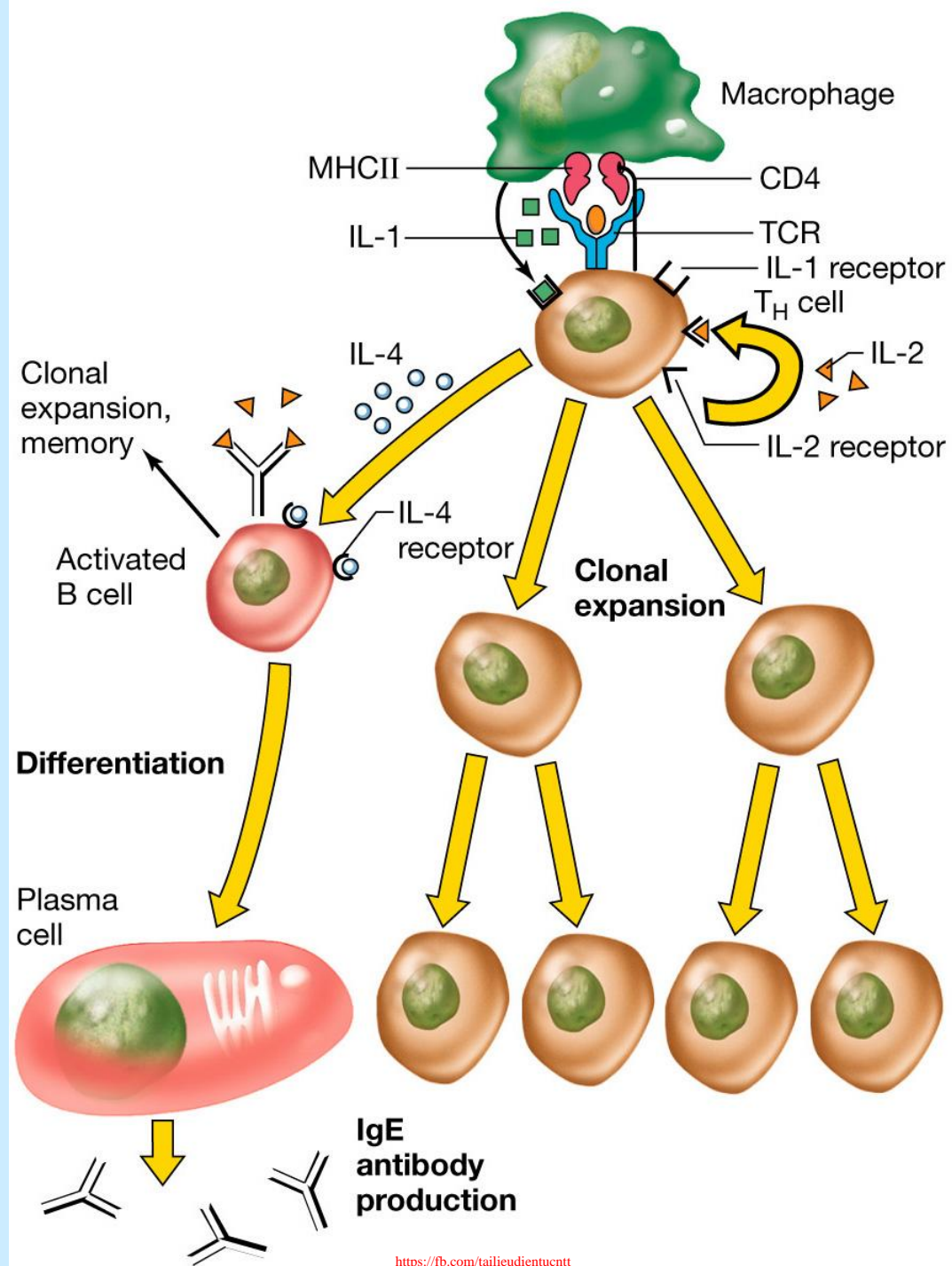
- Interleukine IL: IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12

+ IL1 do đại thực bào được hoạt hóa tiết ra, gắn và hoạt hóa tế bào T_H

+ T_H hoạt hóa sản xuất và tiết IL2, IL4

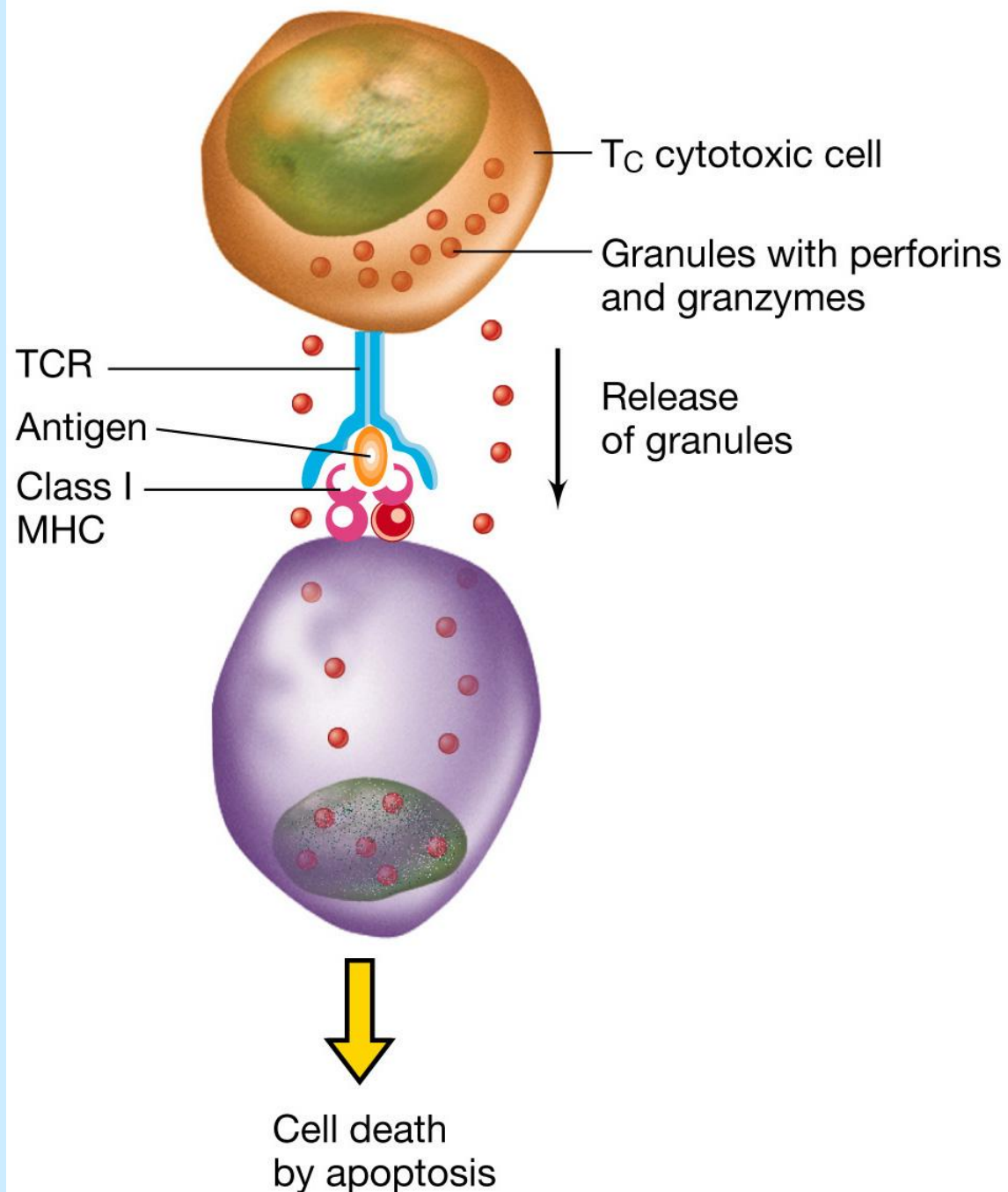
+ IL2 gắn lên chính tế bào T_H kích thích tế bào T_H này phân chia nhanh, hình thành dòng

+ IL4 gắn lên tế bào B kích thích tế bào B phân hóa thành tương bào để sản xuất kháng thể



Miễn dịch tế bào

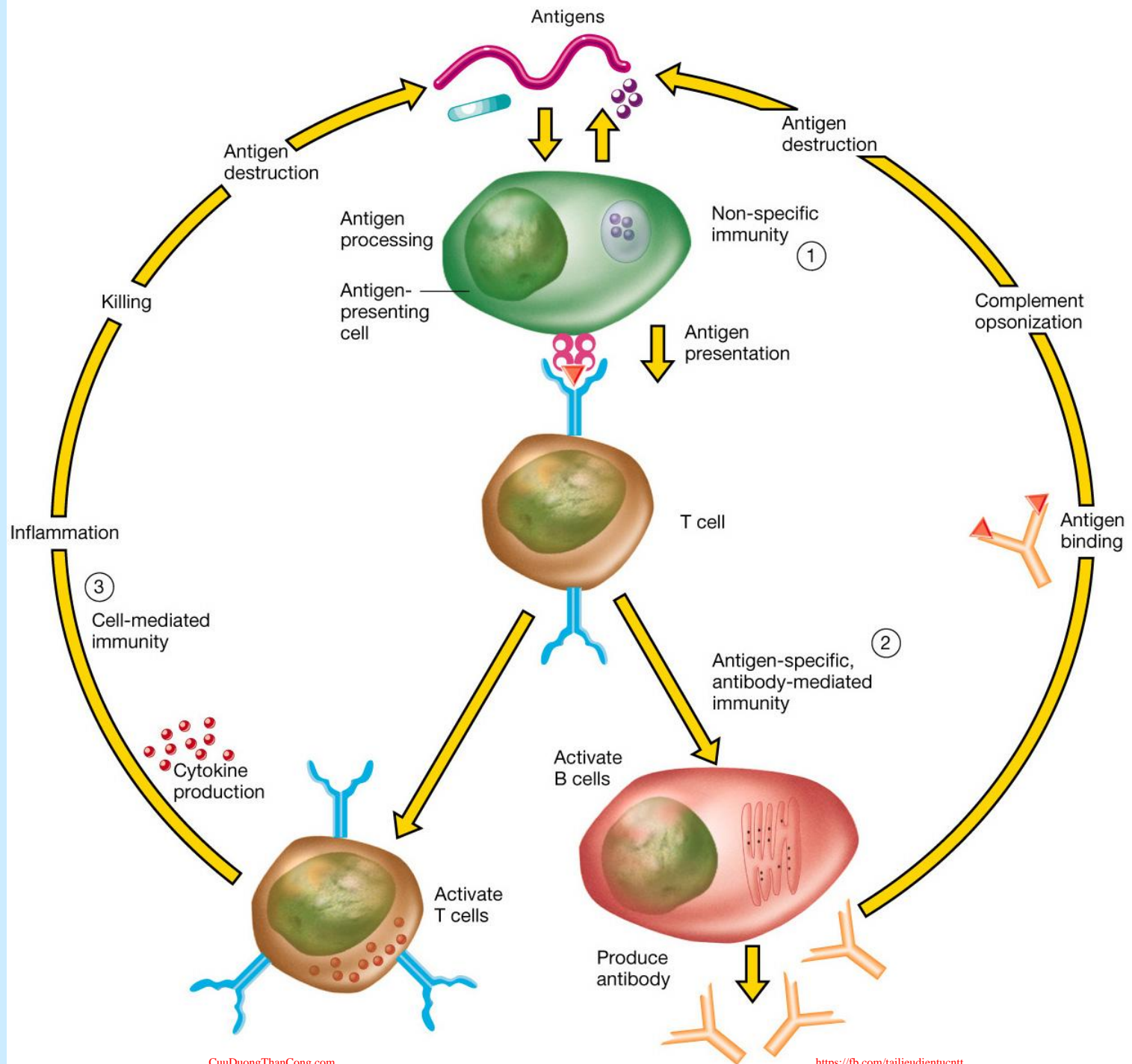
- Miễn dịch tế bào (cellular immunity, cell-mediated immunity)
- Thông qua hoạt động của tế bào T_C được hoạt hóa khi được trình diện kháng nguyên bởi MHC I
- Thông qua tế bào diệt tự nhiên NK (Natural Killer cell): tiêu diệt tế bào lạ bằng perforin khi tiếp xúc mà không cần có sự kích thích bởi một kháng nguyên chuyên biệt
- Thông qua hoạt động của tế bào T_H được hoạt hóa khi được trình diện kháng nguyên bởi MHC nhóm II: tiết ra lymphokine thu hút và hoạt hóa đại thực bào; kích thích tế bào B tăng cường sản xuất kháng thể

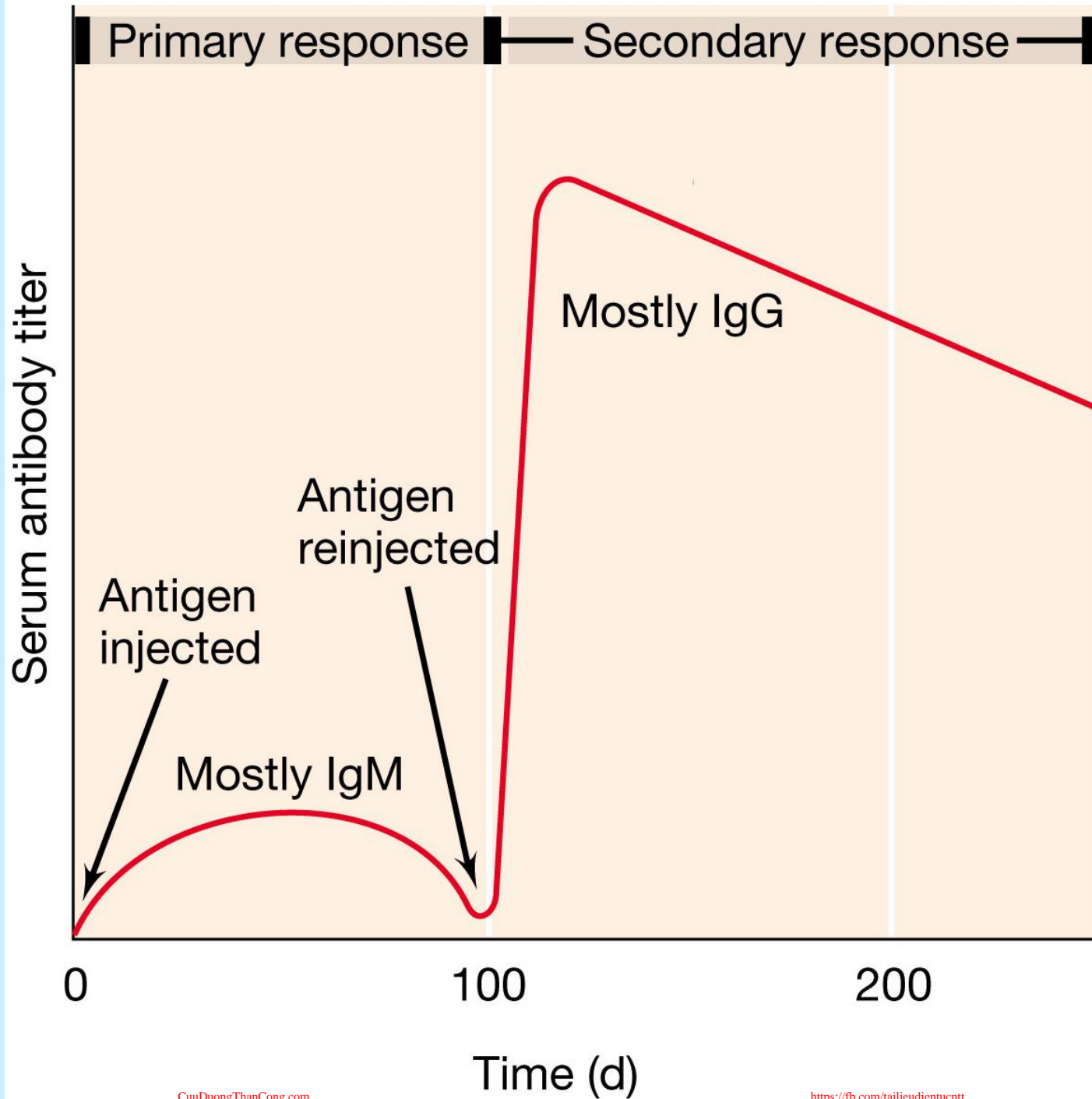


(a)

Các bước hình thành đáp ứng miễn dịch

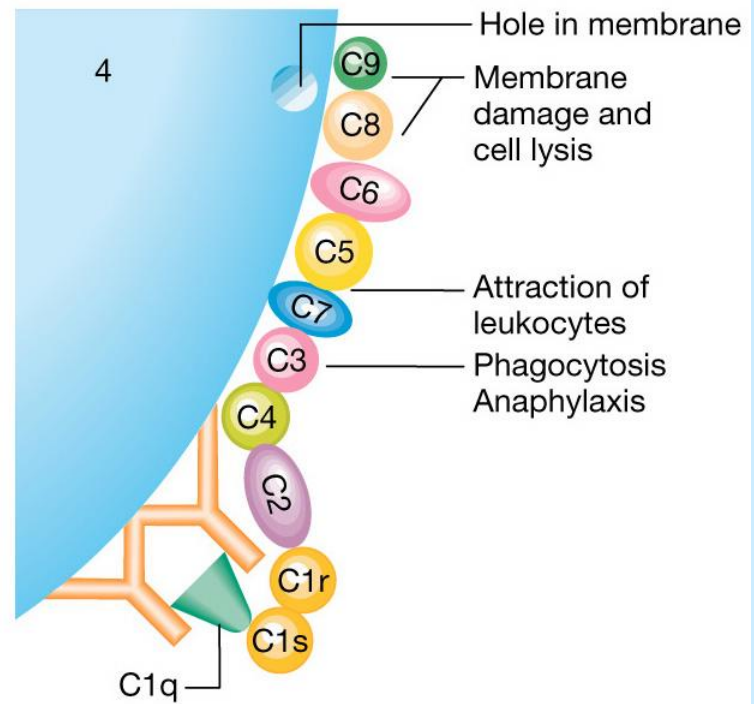
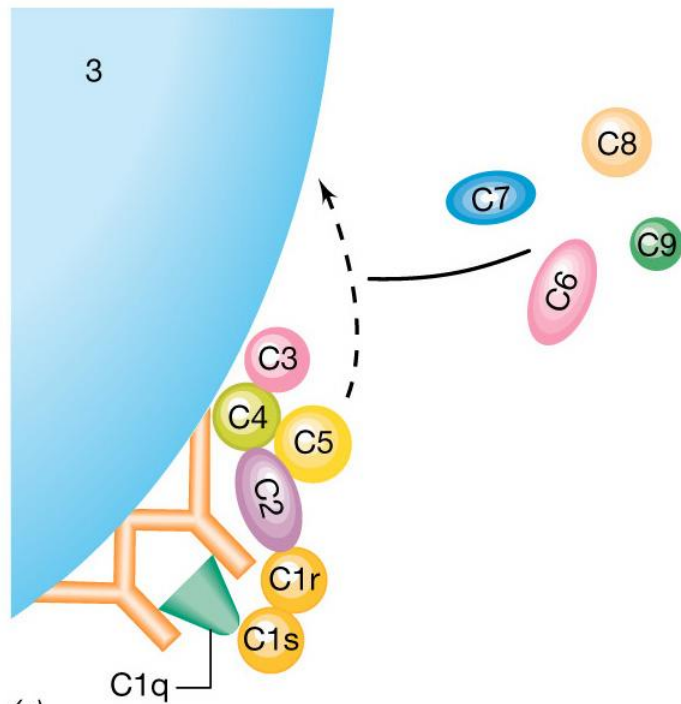
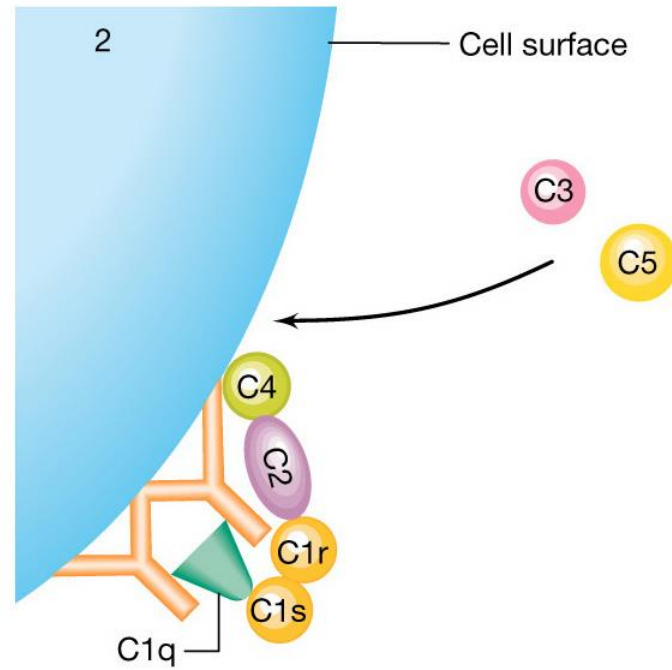
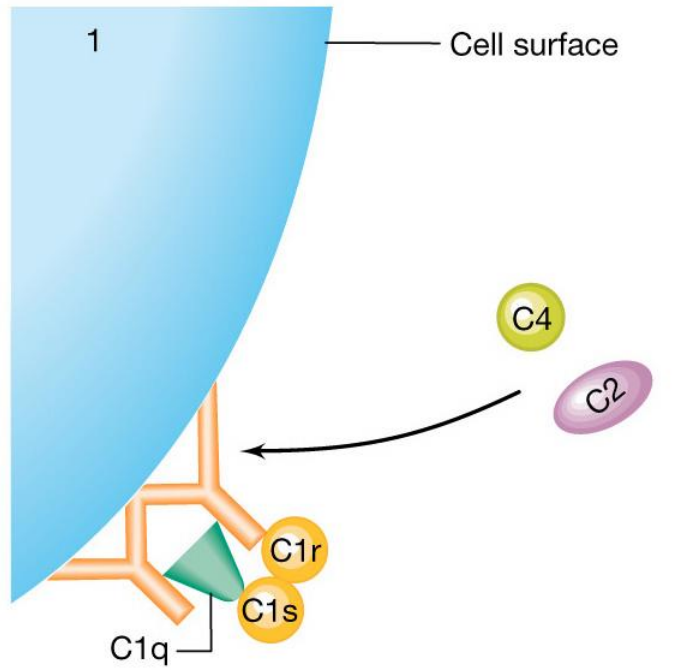
- Vật chủ đáp ứng với sự xâm nhiễm của VSV bệnh bằng một quá trình gồm 3 bước
- Bước 1: VSV gây bệnh bị thực bào
- Bước 2: các thực bào APC trình diện epitope cho các tế bào T
 - + Tế bào T_H1 dẫn dụ và hoạt hóa các đại thực bào, bạch cầu trung tính, gây nên phản ứng viêm, hạn chế sự lan nhiễm của vi sinh vật gây bệnh
 - + Tế bào T_H2 hoạt hóa tế bào B kích thích sự sản xuất kháng thể chuyên biệt cho epitope
- Bước 3: kháng thể gắn lên kháng nguyên trên bề mặt tế bào làm dấu để bổ thể gắn vào làm tan tế bào
- Trường hợp virút có chu kỳ tiềm tan hoặc vi khuẩn ký sinh ngay bên trong tế bào:
 - + Epitope từ ký sinh được trình diện trên tế bào bị nhiễm
 - + Tế bào T_C nhận diện và tiêu diệt trực tiếp tế bào bị nhiễm bằng độc tố perforin
- Đáp ứng miễn dịch chuyên biệt kháng nguyên tồn tại vài năm và được ghi nhớ: khi tiếp xúc kháng nguyên lần hai, đáp ứng miễn dịch sẽ rất nhanh và rất mạnh





Hệ thống bổ thể (complement system)

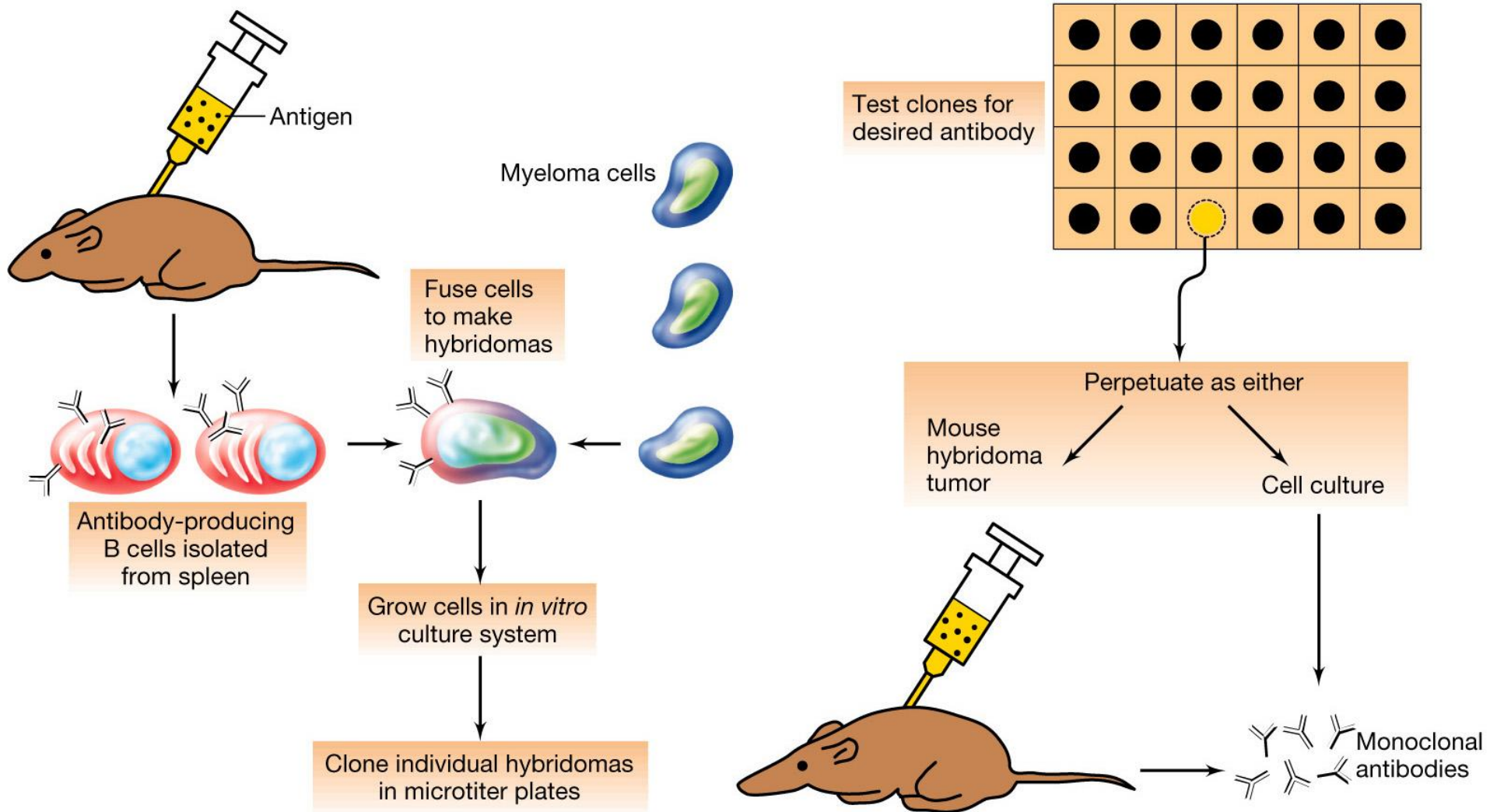
- Hệ thống gồm một chuỗi có thứ tự 11 loại protein bổ trợ (C1, C2, C3..., C11) tương tác một cách có thứ tự với tế bào được gắn kháng thể gây ra sự tan màng hoặc rò rỉ thành phần tế bào
- Các protein bổ trợ hiện diện trong huyết thanh và được hoạt hóa bởi tương tác kháng nguyên-kháng thể
- Phương thức tác động của hệ thống bổ thể:
 - + Làm tan tế bào vi khuẩn, nhất là vi khuẩn Gram âm khi kháng thể gắn với kháng nguyên trên bề mặt tế bào vi khuẩn
 - + Giết chết tế bào vi khuẩn mà không làm tan
 - + Hoạt hóa quá trình thực bào đối với tác nhân gây bệnh có cấu trúc bề mặt ngăn cản sự thực bào (opsonin hóa, opsonization) nhờ ái lực cao của C3 với đại thực bào và tế bào B



(a)

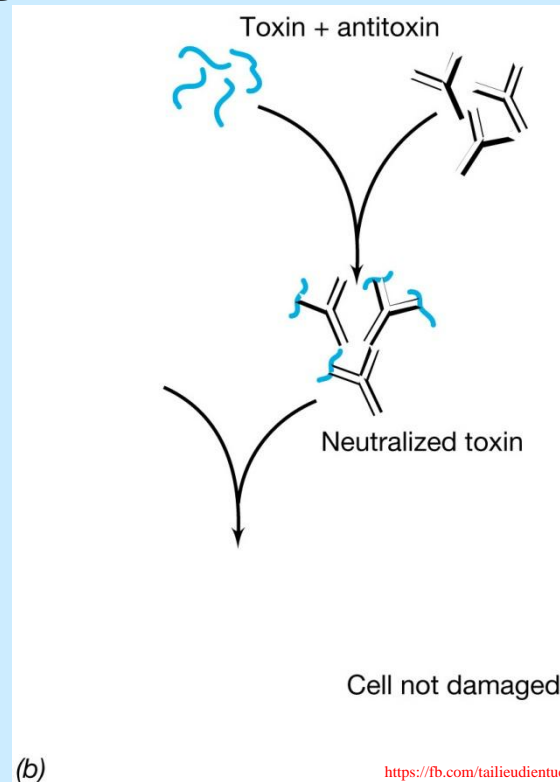
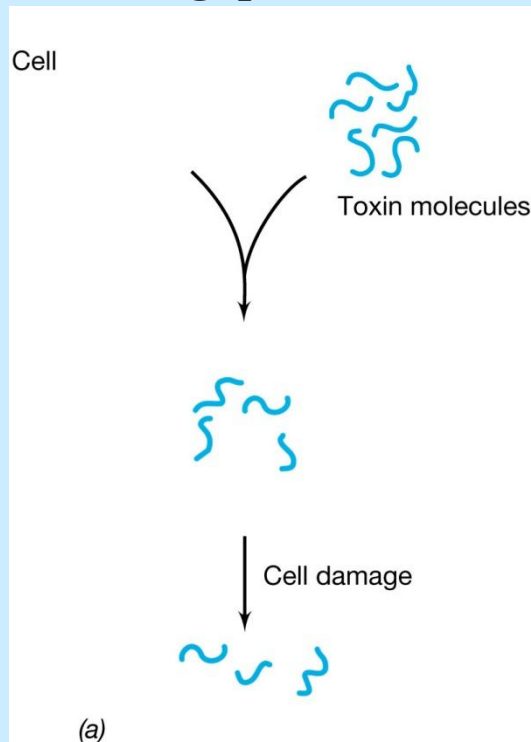
Kháng thể đa dòng và đơn dòng

- Một miễn dịch nguyên có nhiều epitope dẫn đến sự chọn lọc hình thành nhiều dòng tế bào B sản xuất kháng thể khác nhau của cùng một miễn dịch nguyên: kháng thể đa dòng (polyclonal antibody)
- Một dòng tế bào B riêng biệt được phân lập từ hỗn hợp này sẽ tạo kháng thể đồng nhất về tính chuyên biệt, được gọi là kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody)
- Kỹ thuật tạo kháng thể đơn dòng:
 - + Dung hợp tạo tế bào lai (hybridoma) giữa tế bào B đã được gây miễn dịch với tế bào ung thư tủy xương
 - + Chọn lọc hybridoma
 - + Phân lập dòng từ hybridoma
 - + Kiểm chứng khả năng tạo kháng thể của dòng
- Kháng thể đơn dòng chỉ phản ứng với một epitope, ứng dụng:
 - + Phân lập tế bào
 - + Nghiên cứu vị trí hoạt động của enzyme
 - + Định danh vi khuẩn ở mức dưới loài
 - + Đánh dấu và chuyển tải thuốc đến tế bào ung thư trong cơ thể
 - + Các phương pháp thử nhanh protein, kháng nguyên mục tiêu



Ứng dụng tương tác kháng nguyên - kháng thể

- Tính chuyên biệt cao giữa kháng thể với kháng nguyên được ứng dụng trong phát hiện các tác nhân gây bệnh hoặc khối u
- Phản ứng trung hòa kháng nguyên: sự gắn kháng thể vào kháng nguyên (độc tố, enzyme, virút) sẽ làm mất hoạt tính sinh học hoặc hóa học của kháng nguyên
- Phản ứng kết tủa kháng nguyên: kháng nguyên tan trong nước gắn vào các vị trí gắn kháng nguyên kép trên kháng thể tạo thành kết tủa
- Phản ứng ngưng kết kháng nguyên: kháng nguyên là các phần tử không tan sẽ kết tụ lại thông qua liên kết với kháng thể



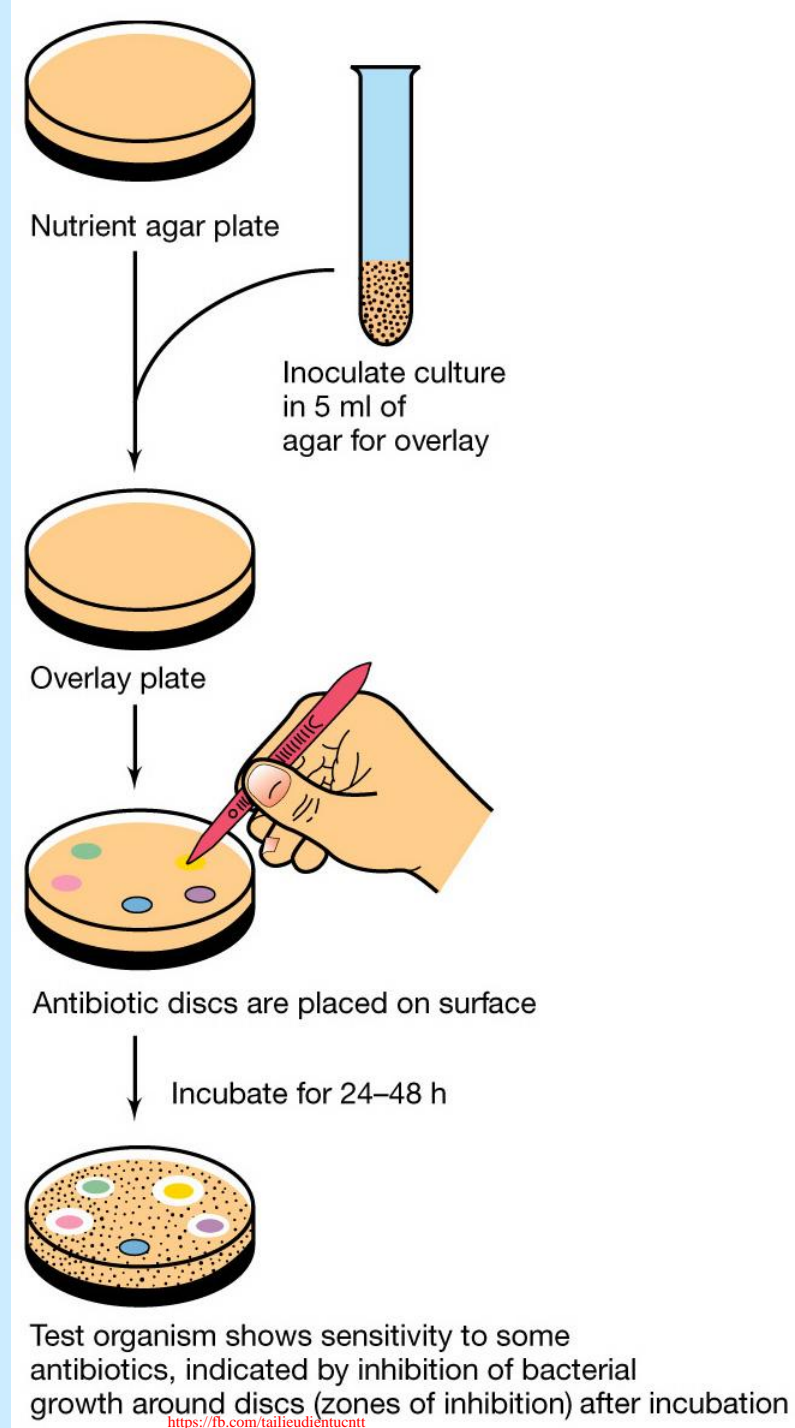
Vi sinh y học

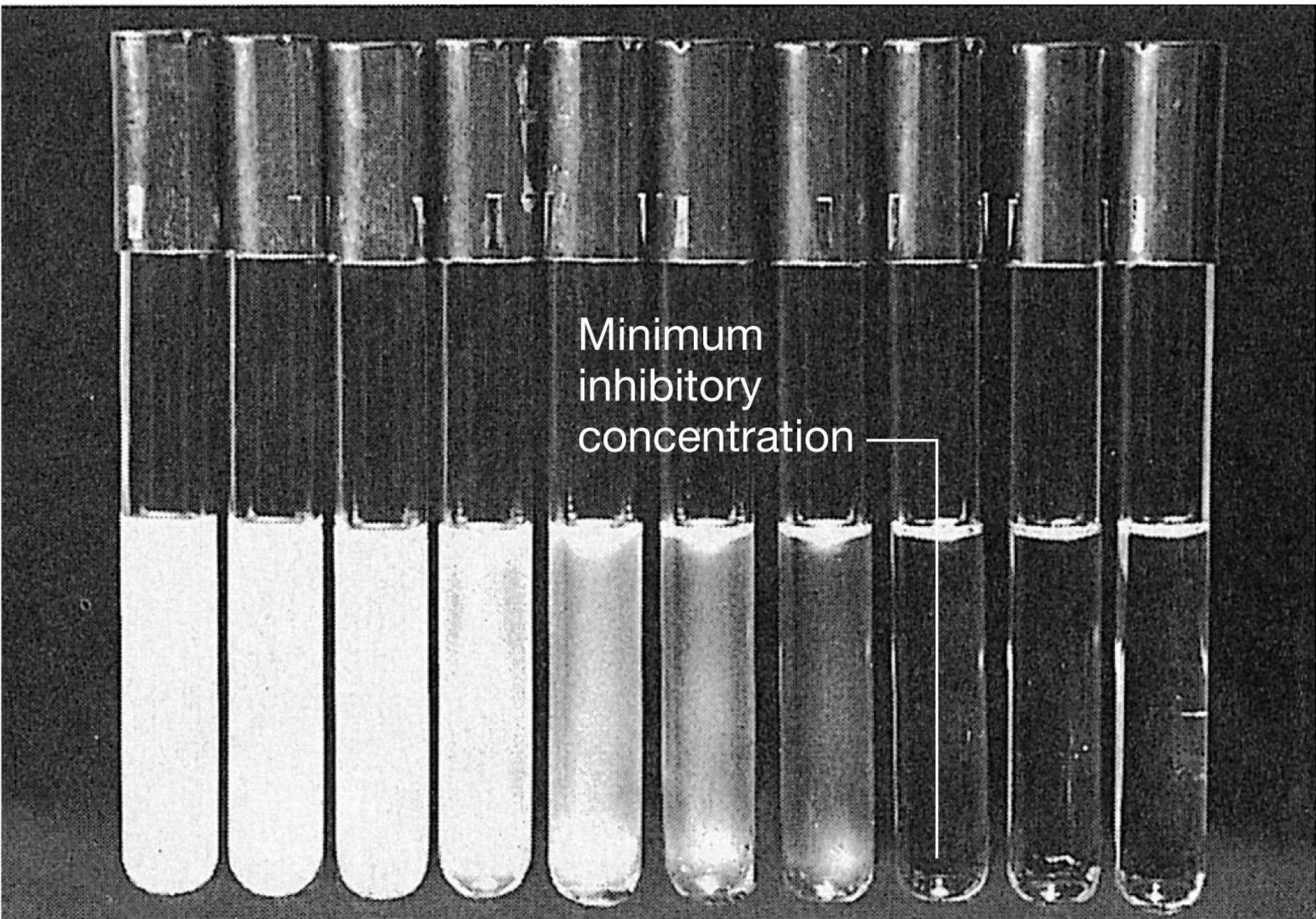
Phân lập và định danh VSV gây bệnh từ bệnh phẩm

- Thu mẫu bệnh phẩm cần đảm bảo tính vô trùng, mẫu cần được phân tích ngay để tránh những biến đổi về hóa học, sinh học trong thời gian bảo quản mẫu
- Phân lập:
 - + Sử dụng môi trường chọn lọc và các điều kiện tăng trưởng hạn chế: môi trường chọn lọc là môi trường chứa các hợp chất ức chế vi sinh vật tạp nhiễm hoặc không mong muốn nhưng không ức chế vi sinh vật gây bệnh nghi vấn
 - + Môi trường phân biệt: để xác định vi khuẩn đã phân lập dựa trên các phản ứng cho kết quả biểu kiến
- Định danh: sử dụng tổ hợp các môi trường phân biệt và các thử nghiệm sinh hóa

Thử nghiệm hiệu lực của kháng sinh và lập kháng sinh đồ

- Phương pháp Kirby-Bauer: độ mẫn cảm (sensitivity) của một chủng gây bệnh với các kháng sinh thường dùng được xác định bằng các đĩa kháng sinh
- Xác định MIC (minimum inhibitory concentration): nồng độ ức chế tối thiểu của một kháng sinh đối với một loài vi khuẩn được xác định bằng cách ủ một loạt các ống nghiệm chứa nồng độ kháng sinh khác nhau và tìm nồng độ thấp nhất không có sự tăng trưởng của vi khuẩn



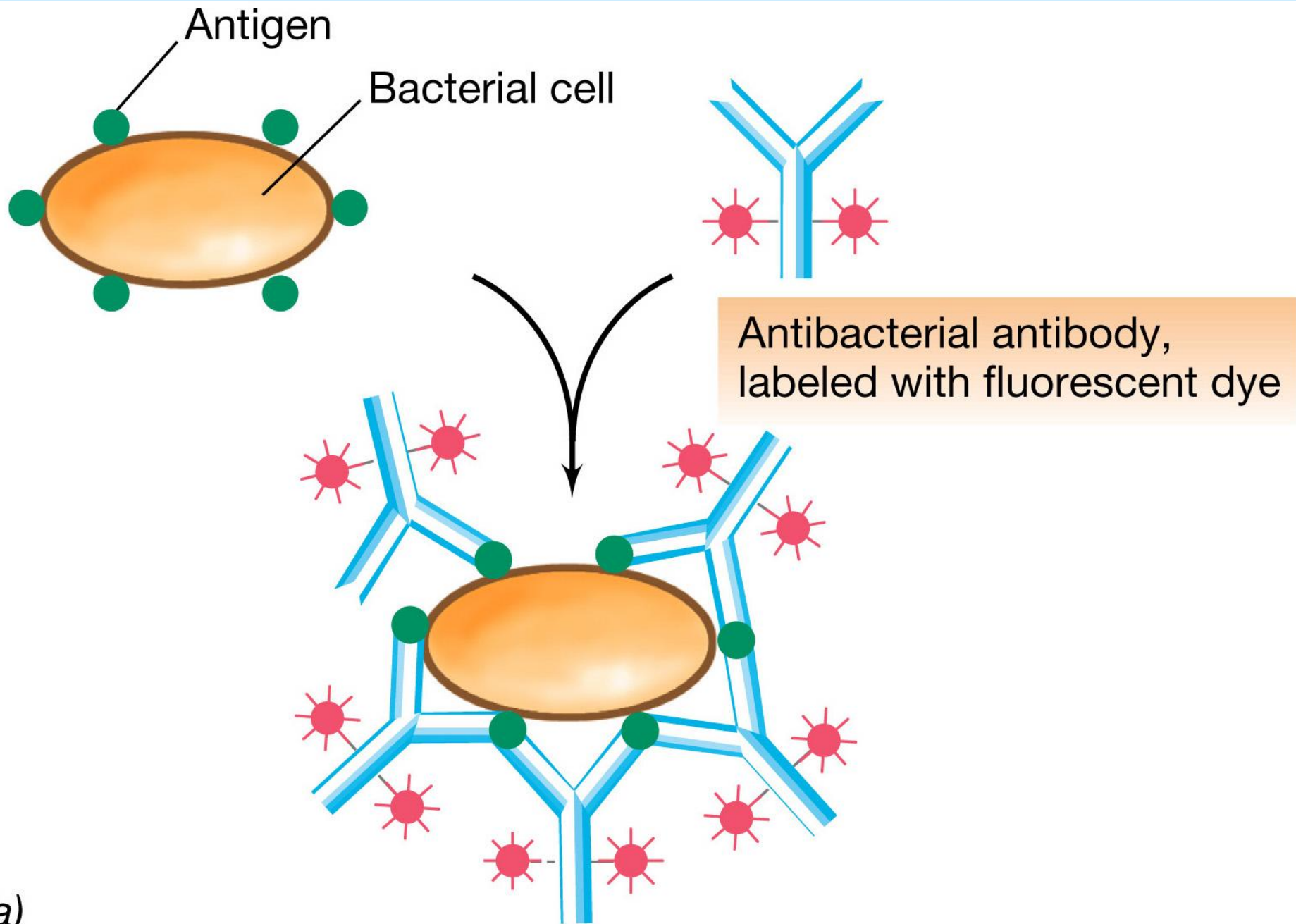


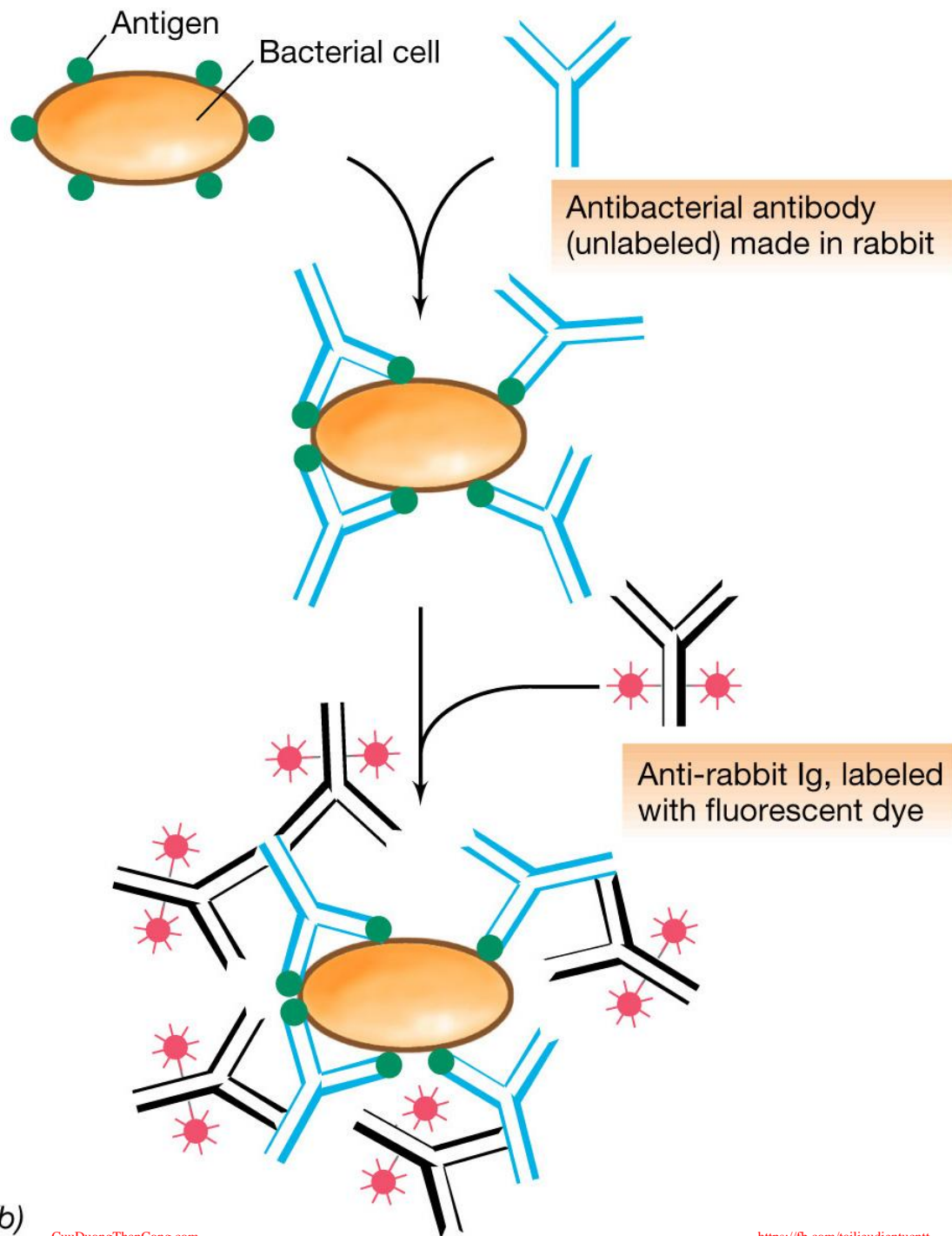
Chẩn đoán miễn dịch

- Hai đặc tính của xét nghiệm miễn dịch:
 - + Tính đặc hiệu (specificity): tính đặc hiệu cao hạn chế kết quả dương tính giả (false positive)
 - + Độ nhạy (sensitivity): độ nhạy cao hạn chế kết quả âm tính giả (false negative)
- Kháng thể đa dòng: cho tín hiệu nền và phản ứng dương tính giả cao do hiện tượng phản ứng chéo
- Kháng thể đơn dòng: làm giảm tín hiệu nền nâng cao độ nhạy; có thể được dùng trong một chương trình sàng lọc trên một nhóm chủng gây bệnh có cùng epitope
- Chẩn đoán miễn dịch có thể thực hiện ngay trên huyết thanh của người xét nghiệm với kháng thể đặc hiệu cho chủng gây bệnh, không cần nuôi cấy, phân lập VSV gây bệnh

Kháng thể phát huỳnh quang

- Kháng thể có thể được đánh dấu bằng huỳnh quang và dùng để phát hiện kháng nguyên mục tiêu hoặc VSV gây bệnh bằng kính hiển vi huỳnh quang.
- Phương pháp nhuộm trực tiếp: mẫu được nhuộm với kháng thể chuyên biệt được đánh dấu huỳnh quang
- Phương pháp nhuộm gián tiếp:
 - + Mẫu được xử lý với kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên mục tiêu được gây miễn dịch ở thỏ (kháng thể sơ cấp, primary antibody)
 - + Kháng thể sơ cấp được nhuộm bằng kháng IgG của thỏ được gây miễn dịch trên một động vật khác (kháng thể thứ cấp, secondary antibody) được đánh dấu huỳnh quang
 - + Ưu điểm: làm tăng độ nhạy và một kháng thể thứ cấp được dùng cho nhiều kháng nguyên mục tiêu kháng nhau





(b)

Xét nghiệm ELISA

- **ELISA: hấp phụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked Immunosorbent assay)**
 - + **Kháng thể được gắn cộng hóa trị với một enzyme**
 - + **Phát hiện sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể được phát hiện bằng hoạt tính enzyme (peroxidase, alkaline phosphatase và β -galactosidase) dựa trên một phản ứng tạo màu**
 - + **Ưu điểm: độ nhạy cao, dễ tự động hóa**
 - + **ELISA trực tiếp: dùng để phát hiện kháng nguyên trong mẫu bệnh phẩm**
 - + **ELISA gián tiếp: dùng để phát hiện kháng thể chuyên biệt trong huyết thanh người bệnh**

Procedure

1. Antibodies (Y) to virus (★) bound to wells of microtiter plate

2. Add patient sample (secretions, serum, and so on) suspected of containing virus particles or virus antigens and wash wells with buffer

3. Add antivirus antibody containing conjugated enzyme



4. Wash with buffer

5. Add substrate for enzyme and measure amount of colored product (●).

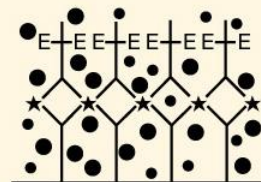
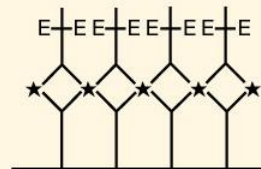
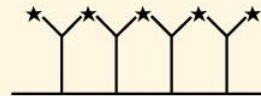
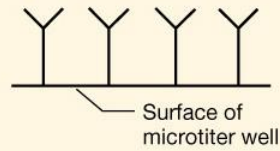
Results

Colored product

Quantitation

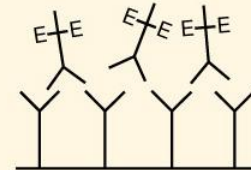
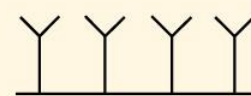
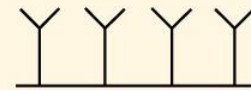
Colored product produced is proportional to amount of antigen.

Positive test

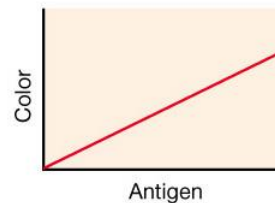


++

Negative test



—



Procedure

1. Coat microtiter wells with antigen preparation from disrupted HIV particles (★)

2. Add patient serum sample. HIV-specific antibodies bind to HIV antigen. Other antibodies do not bind

3. Wash with buffer

4. Add human anti-IgG antibodies conjugated to enzyme (E + E)

5. Wash with buffer

6. Add substrate for enzyme and measure amount of colored product (●).

Results

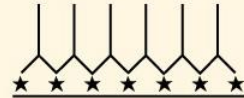
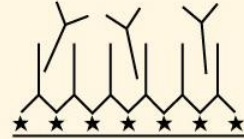
Colored product

Quantitation

Colored product produced is proportional to the antibody concentration.

Positive test

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★
Surface of microtiter well



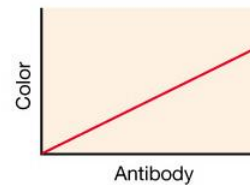
++

Negative test

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



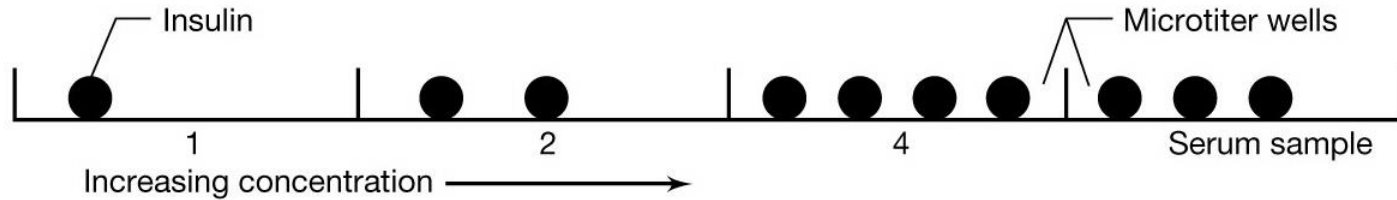
-



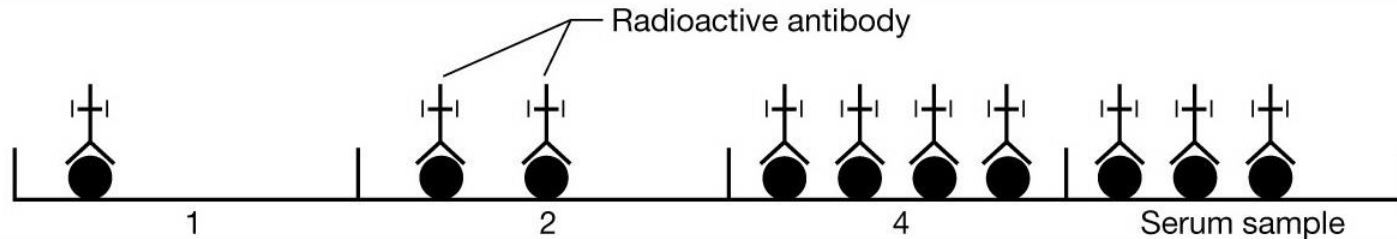
Xét nghiệm miễn dịch phóng xạ

- Sử dụng kháng thể đánh dấu bằng phóng xạ ^{125}I
- Dùng để đo lượng protein dạng vết (kích thích tố tăng trưởng, hormone) trong máu
- Quy trình thường gồm 2 bước:
 - + Kháng nguyên được cố định trong các giếng microplate ở những lượng nhất định, kháng thể đánh dấu được bổ sung và lượng phóng xạ được ghi; lập đường chuẩn lượng kháng nguyên theo lượng phóng xạ
 - + Mẫu chứa kháng nguyên được bắt động lên giếng và bổ sung kháng thể; tính lượng phóng xạ, suy ra lượng kháng nguyên

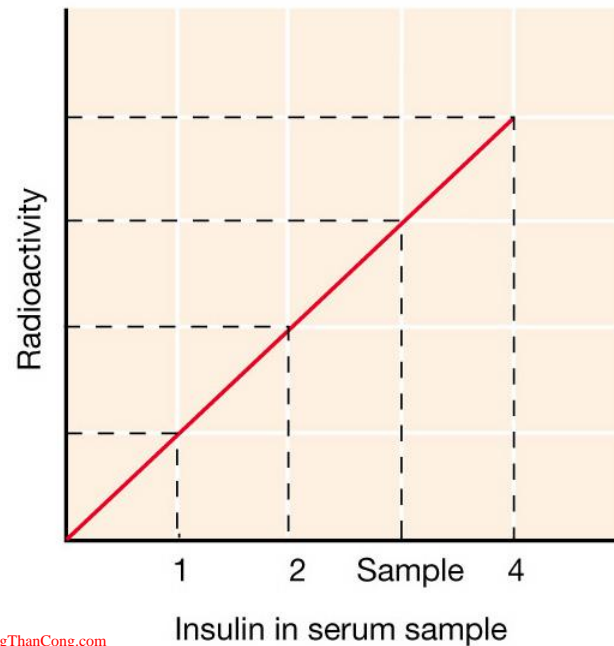
1. Bind insulin to wells of microtiter plate



2. Add excess anti-insulin antibodies that are labeled with ^{125}I ; wash to remove unbound antibody



3. Count radioactivity in gamma radiation counter. Wells labeled 1, 2, and 4 establish a standard curve with known amounts of antigen (insulin). The radioactivity in the last well indicates, by comparison to the standard curve, how much insulin is present in a known amount of serum.



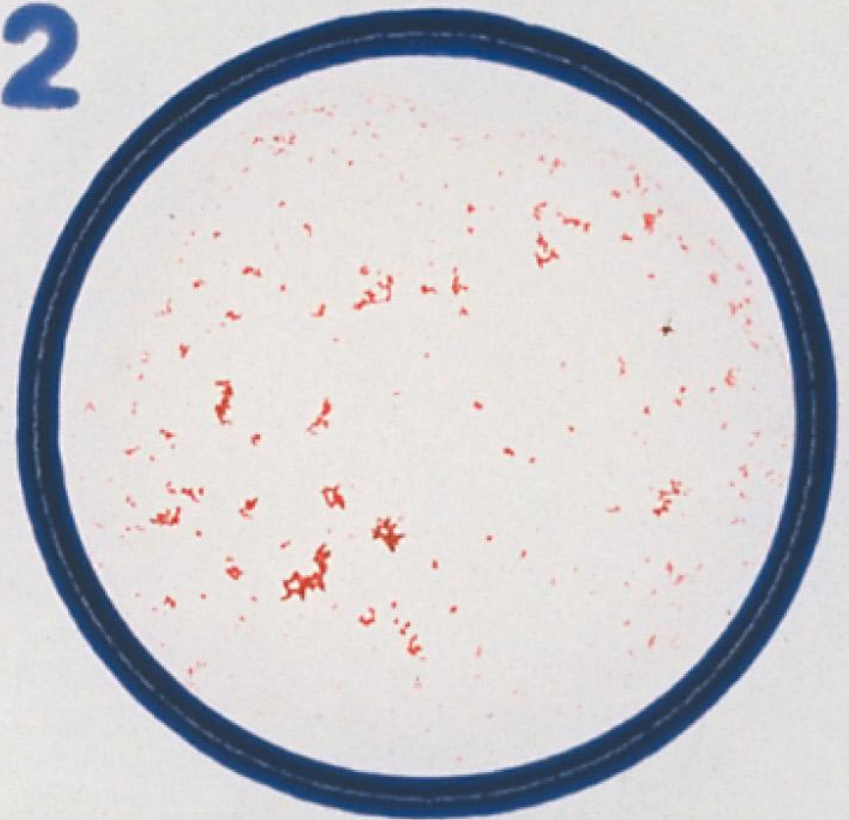
Xét nghiệm ngưng kết

- Kháng nguyên hoặc kháng thể lên một hạt nhựa
- Nếu có sự hiện diện của kháng nguyên thì phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ hình thành những ngưng kết
- Ưu điểm: nhanh, rẻ tiền, thích hợp cho các chương trình sàng lọc diện rộng, không cần thiết bị đặc tiền

1



2

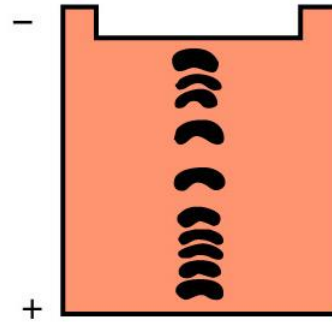


John Martinko and Cheryl Broadie

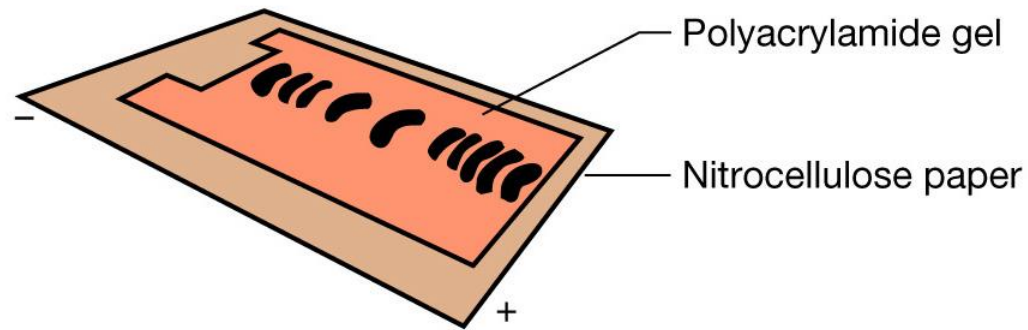
Xét nghiệm immunoblot (immuno-hybridization)

- Dựa trên phản ứng lai màng giữa kháng nguyên và kháng thể
- Protein trong mẫu được phân đoạn bằng điện di trên gel polyacrylamid
- Các vạch protein được chuyển thấm (blot) lên màng nitrocellulose (màng lai)
- Thực hiện lai kháng nguyên mục tiêu bằng kháng thể chuyên biệt được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc phát huỳnh quang
- Vạch lai được phát hiện bằng ảnh trên phim hoặc bằng vết màu trên màng lai
- Ưu điểm: độ nhạy và tính chuyên biệt rất cao, nhưng có nhược điểm là qui trình phức tạp và mất thời gian
- Thường được sử dụng cho các xét nghiệm khẳng định, không dùng cho mục đích tầm soát hoặc sàng lọc diện rộng

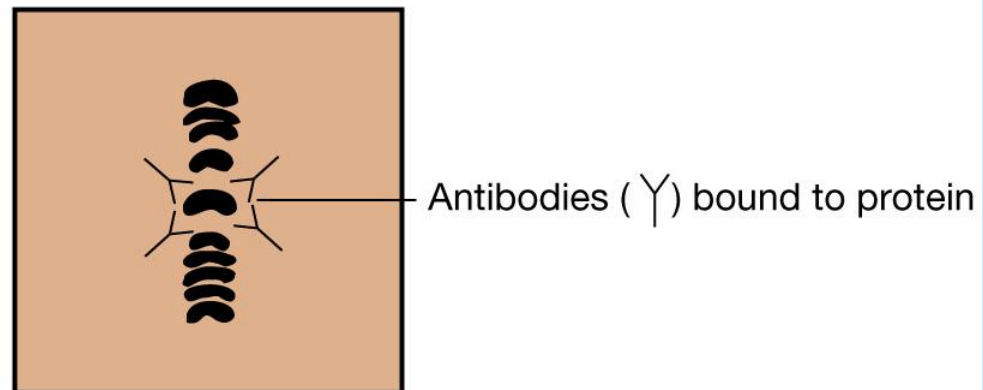
1. Denature proteins by boiling in detergent



2. Subject to electrophoresis; proteins separate by molecular weight

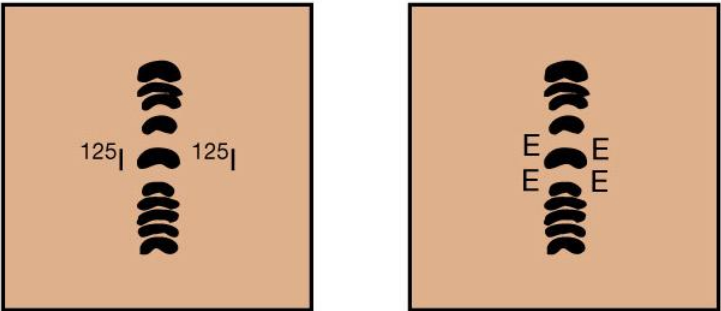


3. Blot the separated proteins from the gel to nitrocellulose paper

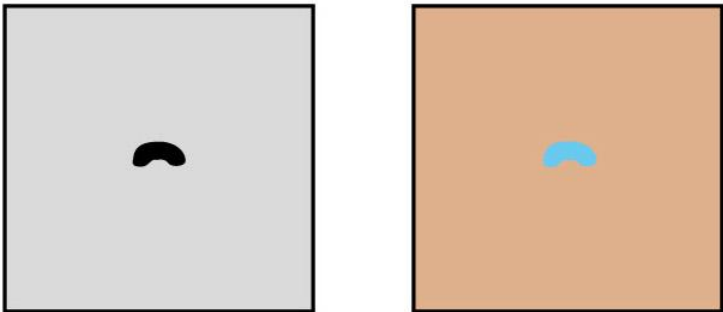


(a)

4. Treat nitrocellulose paper containing blotted proteins with antibodies; each antibody recognizes and binds to a specific protein, labeling the protein for detection

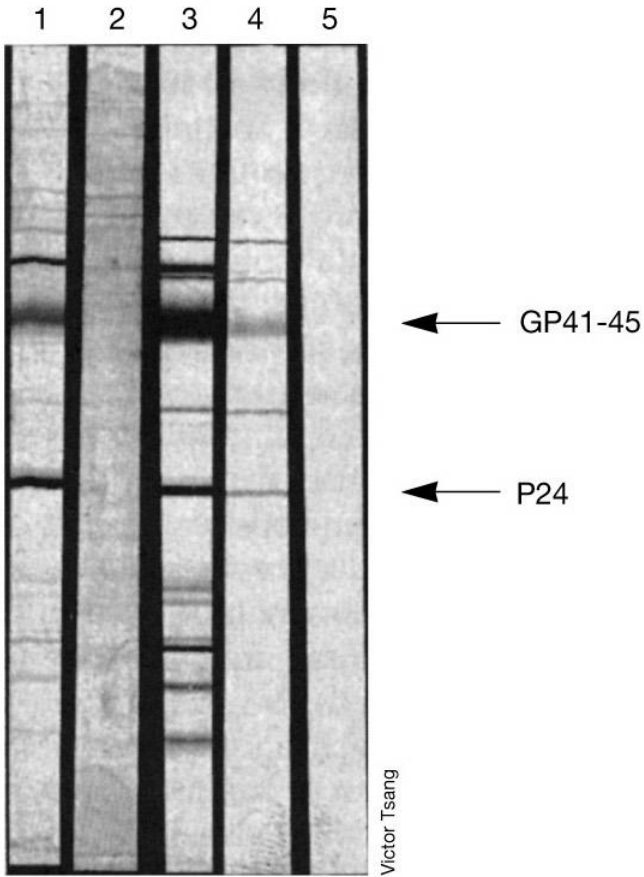


5. Add marker to bind to antigen–antibody complexes, either (left) radioactive *Staphylococcus* protein A–¹²⁵I, or (right) antibody containing conjugated enzyme



X-ray film

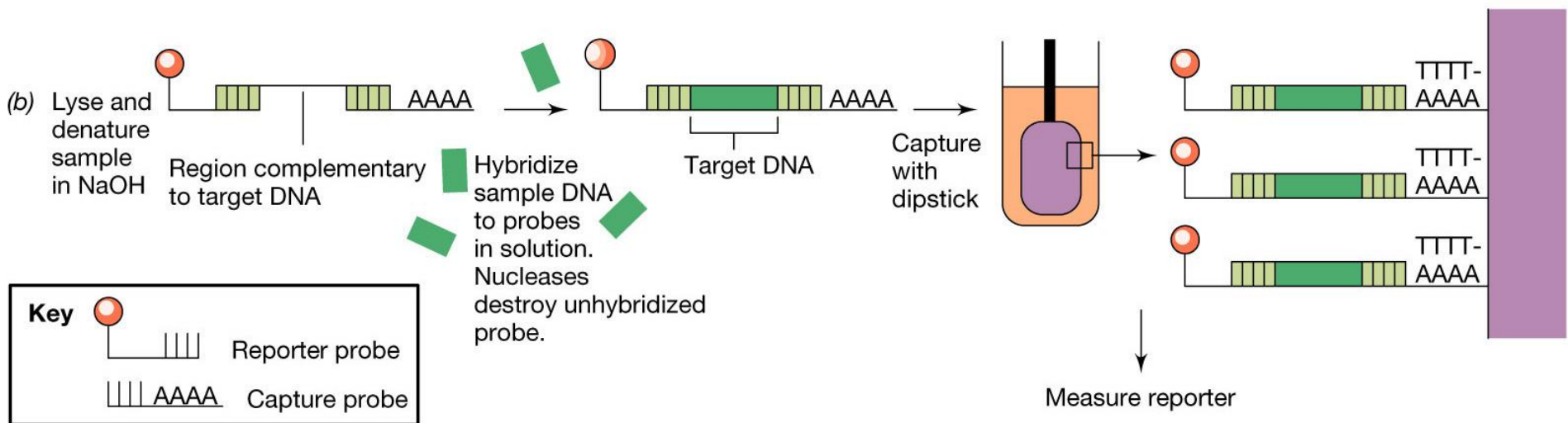
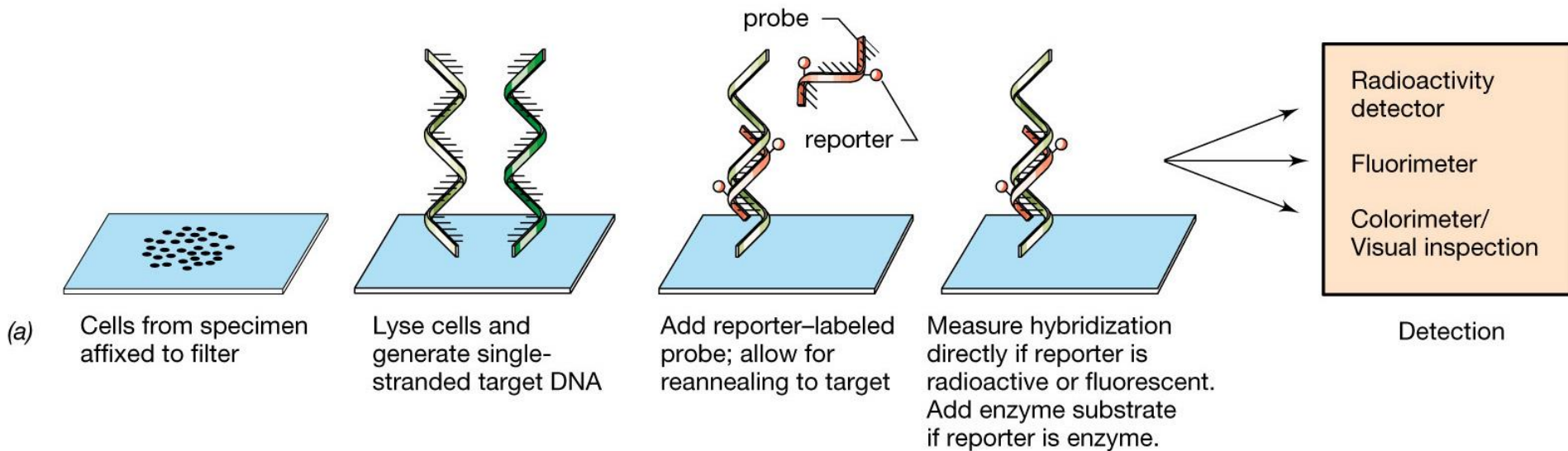
Nitrocellulose with enzyme-produced colored spot

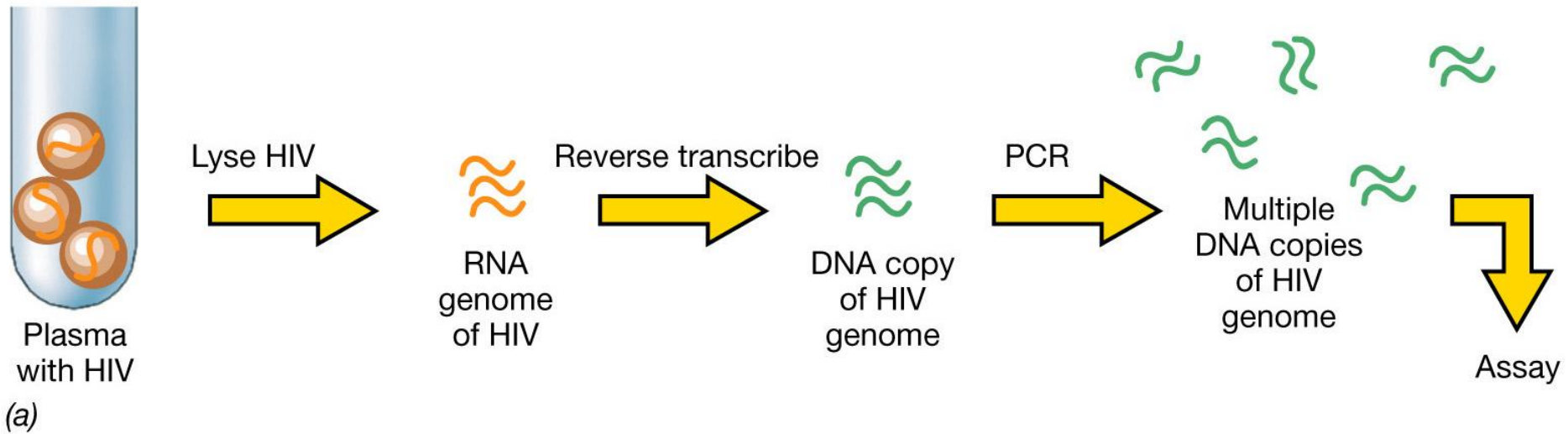


(b)

Xét nghiệm dựa trên nucleic acid

- Lai in situ (in situ hybridization):
 - + Sử dụng mẫu dò nucleic acid (nucleic acid probe) có trình tự chuyên biệt, được đánh dấu bằng phóng xạ hoặc bằng chất phát quang
 - + Chuyển các khuẩn lạc lên màng lai hoặc chuyển mẫu lên lam kính
 - + Xử lý mẫu, biến tính DNA
 - + Thực hiện lai với mẫu dò và phát hiện vết lai
 - + Ưu điểm: độ nhạy và tính chuyên biệt rất cao
- Vân tay DNA (DNA fingerprinting):
 - + Hầu hết vi khuẩn đều chứa plasmid nhưng có chủng loại và số lượng khác nhau
 - + Sự đa hình này được phân tích bằng điện di trên gel agarose
 - + Kiểu vạch tạo thành được dùng trong chẩn đoán và xác định mối quan hệ giữa các chủng nghi bệnh được phân lập
 - + Định danh đến mức dưới loài
- Phản ứng PCR (polymerase chain reaction):
 - + Dựa trên khả năng nhân bản sao của một trình tự gen mục tiêu ở VSV gây bệnh của phản ứng PCR bằng cặp mồi chuyên biệt
 - + Được ứng dụng nhiều trong phát hiện VSV gây bệnh, đặc biệt là virút





Dịch tễ học và vi sinh vật học cộng đồng

Bệnh do vi sinh vật