

Chương 11. Định danh và phân loại vi khuẩn

Mục lục

Chương 11. Định danh và phân loại vi khuẩn.....	1
11.1. Giới thiệu.....	3
11.2. Xác định vi khuẩn	3
11.2.1. Xác định hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường rắn	3
11.2.2. Tăng trưởng trên môi trường lỏng	4
11.2.3. Đặc điểm ứng sinh hoá	4
11.2.4. Cấu trúc kháng nguyên	12
11.2.5. Tính gây bệnh cho động vật.....	12
11.2.6. Nhạy cảm với kháng sinh	12
11.2.7. Phân kiểu (typing) các chủng vi khuẩn.....	12
11.2.8. Phương pháp định danh nhanh	13
11.3. Phân loại vi khuẩn.....	20
11.3.1. Phân loại vi khuẩn theo cách tiếp cận phát sinh chủng loài	20
11.3.2. Phân loại theo Adansonian	21
11.3.3. Phân loại di truyền	22
11.4. So sánh trình tự sinh học	22
11.4.1. Định dạng FASTA	23
11.4.2. Phân tích cấu trúc tương đồng bằng công cụ BLAST	23
11.4.3. So sánh trình tự sinh học.....	24
11.4.4. Mối quan hệ giữa phân tích tiến hóa và so sánh trình tự	25
11.5. Cây phát sinh chủng loài	25
11.6. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loài.....	26
11.6.1. Phương pháp hà tiện tối đa	27
11.6.2. Phương pháp khoảng cách.....	27

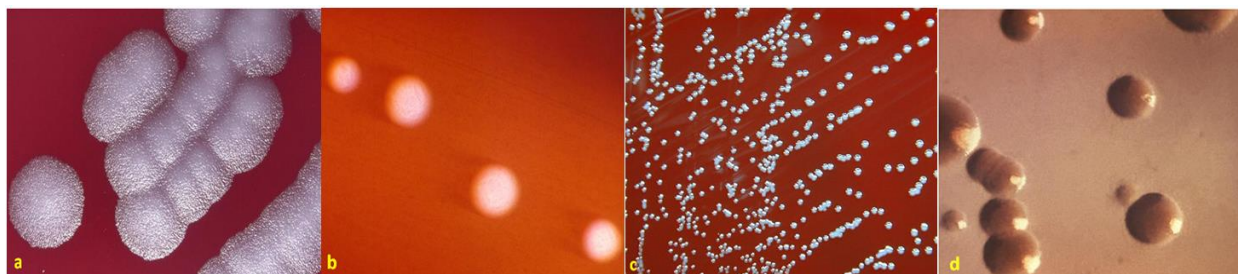
11.6.3. Phương pháp hợp lý cực đại	28
11.7. Phân loại trong phạm vi của loài.....	28
11.8. Danh pháp vi sinh vật.....	29

11.1. Giới thiệu

Nhiều vi khuẩn không thể phân biệt được qua hình thái và kết quả nhuộm vì chúng tương đối giống nhau nên nhiều trường hợp không thể sử dụng kính hiển vi để xác định vi khuẩn. Vì vậy các phương pháp nghiên cứu sâu hơn là cần thiết để xác định và định danh chính xác về vi khuẩn. Vì mục đích này, vi khuẩn được nuôi cấy để tăng trưởng trong phòng thí nghiệm.

11.2. Xác định vi khuẩn

Việc định danh chính xác vi khuẩn có liên quan đến các bước sau: (1). Xem đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường rắn, (2). Quan sát sự tăng trưởng của chúng trong môi trường lỏng, (3). Đánh giá kết quả phản ứng sinh hoá, (4). Cấu trúc kháng nguyên, (5). Khảo sát đặc tính gây bệnh ở động vật, (6). Tính nhạy cảm với kháng sinh, (7). Kết quả phân kiểu chủng vi khuẩn, (8). Sử dụng phương pháp định danh nhanh và (9). Sử dụng phương pháp phân tử để xác định vi sinh vật.



Hình 11.1. Ví dụ về hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn (a). *Bacillus anthracis* trên môi trường thạch máu (20X) sau khi ủ 24 giờ ở 37°C, khuẩn lạc có màu trắng xám, phẳng hay lồi nhẹ, tròn không đều, có gờ nhấp nhô nhẹ và có hình dạng kính mờ, không tiêu huyết; (b). Khuẩn lạc *Bacteroides variabilis* trên môi trường thạch máu (15x); (c). *Brucella melitensis* trên môi trường thạch máu sau 48 giờ ủ, khuẩn lạc nhẵn, giống như đầu ghim, mờ đục hoàn toàn, không tiêu huyết; (d). *Yersinia pestis* trên môi trường thạch tim có bổ sung máu. Khuẩn lạc bóng sáng, bề mặt khuẩn lạc trông giống màu đồng (CDC).

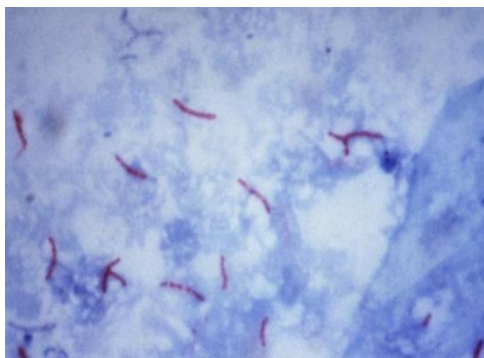
11.2.1. Xác định hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường rắn

Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường rắn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như đặc tính tự nhiên của môi trường nuôi cấy, nhiệt độ và thời gian ủ, tuổi của chủng nuôi

cây và các công đoạn phân lập, làm thuần. Đặc điểm cần chú ý của khuẩn lạc về hình dạng, kích thước, bề mặt, độ gờ, mức độ nhô lên, độ trong, màu sắc và sự tiêu huyết theo các tiêu chí như sau: (a). Kích thước khuẩn lạc có thể tính bằng mm. (b). Hình dạng khuẩn lạc có thể tròn, bất định và bề mặt khuẩn lạc có thể nhẵn, ráp hay dạng hạt. (c). Mức độ cong lõm của khuẩn lạc trên môi trường phân lập hay nuôi cấy thuần, khuẩn lạc có thể phẳng, nhô lên, mức độ lõm. (d). Độ gờ có thể là toàn vẹn, phân thủy, có khía, nhấp nhô hay có lông. (e). Màu sắc của khuẩn lạc có thể trong suốt, trong mờ hay đục. (f). Đặc điểm khác như một số khuẩn lạc vi khuẩn tạo sắc tố và tiêu huyết xung quanh khuẩn lạc.

11.2.2. Tăng trưởng trên môi trường lỏng

Môi trường dinh dưỡng và nước peptone thường được sử dụng như là môi trường lỏng cho vi khuẩn tăng trưởng. Đặc điểm tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng sẽ cung cấp một số đầu mối cho định danh ban đầu. Ví dụ, *Streptococcus* tạo sự lắng hạt ở đáy môi trường lỏng, ngược lại vi khuẩn Gram âm tạo ra độ đục đồng nhất. *Pseudomonas* spp. và các vi khuẩn hiếu khí có khuynh hướng tạo ra màng mỏng trên bề mặt môi trường lỏng. Việc sản sinh ra sắc tố của một số vi khuẩn như *Pseudomonas aeruginosa* có thể thấy rõ trong môi trường lỏng.



Hình 11.2. *Mycobacterium tuberculosis* sử dụng kỹ thuật nhuộm acid-fast Ziehl-Neelsen, 1000X. Nhuộm acid-fast phụ thuộc vào khả năng của mycobacteria vẫn lưu giữ được chất màu khi được xử lý với acid khoáng hoặc dung dịch acid-alcohol như Ziehl-Neelsen hay nhuộm Kinyoun là phương pháp carbolfuchsin chuyên biệt cho *M. tuberculosis* (CDC).

Nhuộm gram là kỹ thuật được sử dụng rộng rãi để phân biệt Gram âm và Gram dương. Nhuộm Ziehl–Neelsen để phân biệt trực khuẩn không bị mất màu sau khi nhuộm acid (acid-fast) ví dụ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*. Nhuộm Albert được sử dụng để chứng minh các hạt dị nhiễm sắc trong *Corynebacterium diphtheriae*

11.2.3. Đặc điểm ứng sinh hoá

Đặc điểm sinh hoá là thuộc tính rất quan trọng trong định danh các chủng vi khuẩn

phân lập và trong định danh phân biệt giữa các loài vi khuẩn với nhau. Thử nghiệm sinh hóa phụ thuộc vào sự có mặt của một số enzyme được vi khuẩn tạo ra như catalase, oxidase, urease, gelatinase, Thử nghiệm sinh hoá thường được sử dụng như sau:

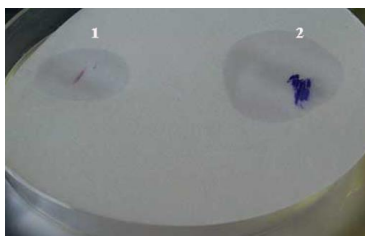
Thử nghiệm catalase: thử nghiệm catalase được sử dụng để phát hiện enzyme catalase có trong vi khuẩn. Enzyme catalase xúc tác phá vỡ hydrogen peroxide để phóng thích oxygen tự do. Chất này được phát hiện trong hầu hết vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí tùy nghi, ngoại trừ *Streptococcus* spp. Catalase không phát hiện trong vi khuẩn kỵ khí. Các tế bào máu đỏ có chứa catalase vì vậy sự hiện diện của chúng sẽ cho kết quả dương tính giả.



Hình 11.3. Kết quả thử nghiệm catalase, (1). Kết quả dương, (2). Kết quả âm.

Thử nghiệm catalase chủ yếu được sử dụng để phân biệt *Staphylococcus* và *Streptococcus*. Trong thử nghiệm này, sử dụng que cấy vòng platinum vô trùng lấy một lượng nhỏ chủng phân lập trên môi trường thạch dinh dưỡng cho vào lam kính đã có vài giọt dung dịch hydrogenperoxide 3%. Phản ứng được cho là dương tính khi xuất hiện bọt khí và ngược lại không có bọt khí là âm tính.

Thử nghiệm oxidase: thử nghiệm này dùng để xác định sự hiện diện của enzyme oxidase trong nhiều vi khuẩn. Enzyme oxidase xúc tác phản ứng oxi hoá của cytochrome ở trạng thái khử nhờ phân tử oxygen. Thuốc thử Kovac's có tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride là thành phần chính được sử dụng trong thử nghiệm oxidase. Chất màu này là cơ chất chọn lọc cho phản ứng cytochrome oxidase. Ở trạng thái khử, thuốc thử này thì không màu nhưng khi ở trạng thái oxi hoá nó có màu tía. Thử nghiệm oxidase có thể được tiến hành bằng một số phương pháp gồm: (i). Phương pháp giấy lọc khô, (ii). Phương pháp giấy lọc ướt và (iii). Phương pháp trên đĩa.

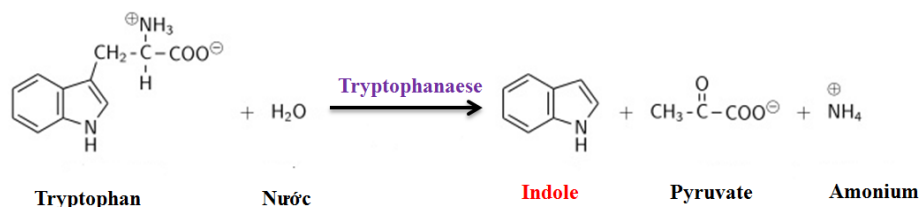
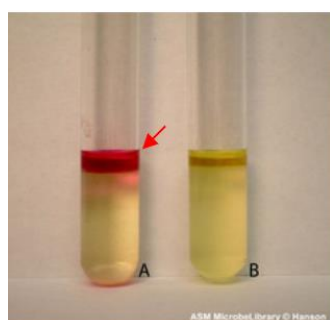


Hình 11.4. Thử nghiệm oxidase (1). Kết quả âm tính, (2). Kết quả dương tính.

Phương pháp giấy lọc khô được tiến hành bằng cách cho thấm vào mảnh giấy lọc thuốc thử Kovac's oxidase 1%. Sau đó trải vi khuẩn lên giấy đã tẩm thuốc thử bằng que

cây thủy tinh. Kết quả dương tính khi xuất hiện màu tía trên giấy lọc sau 10 giây. Màu giấy lọc không thay đổi là kết quả âm tính. Vi khuẩn có oxidase dương gồm *Neisseria* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* spp. và *Moraxella* spp. Vi khuẩn có oxidase âm gồm các thành viên thuộc họ vi khuẩn đường ruột Enterobacteriaceae.

Thử nghiệm indol: thử nghiệm indole được sử dụng để phát hiện khả năng vi khuẩn phân huỷ amino acid dạng tryptophan thành indole tích lũy trong môi trường. Môi trường lỏng tryptophan hay peptone là môi trường được sử dụng cho thử nghiệm indole. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường, ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ. Sau đó nhỏ 5 giọt thuốc thử Kovac's có chứa amyl hay isoamylalcohol, *p*-dimethyl amino benzaldehyde và thêm hydrochloric acid đậm đặc. Sự sản sinh ra indole được minh họa bằng phản ứng sau:



Hình 11.5. Kết quả thử nghiệm indole, (A). Kết quả dương tính. (B). Kết quả âm tính.

Kết quả dương tính khi có biểu hiện vòng đỏ trên bề mặt môi trường lỏng. Không có sự thay đổi màu là kết quả âm tính. Lưu ý tổng hợp kết quả thử nghiệm indole cần theo các điểm sau: (i) chủng cần thử nghiệm sinh indole phải được ủ trong điều kiện kỵ khí và (ii) hoạt tính tryptophanase hoạt động tối thích ở pH kiềm nhẹ từ 7,4 - 7,8. Vì vậy ở pH giảm thì sự sản sinh indole sẽ giảm theo và kết quả thử nghiệm thu nhận được có thể là âm tính giả.

Vi khuẩn có indole dương gồm *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Proteus vulgaris* và *Edwardsiella* spp. Vi khuẩn có indole âm là *Salmonella typhi*, *Klebsiella* spp. và *P. mirabilis*.

Thử nghiệm lên men carbohydrate: thử nghiệm lên men carbohydrate được thực hiện để xác định khả năng vi khuẩn lên men carbohydrate đặc trưng được phối chế trong

môi trường cơ bản, tạo acid hay sinh acid cùng với sinh hơi thấy được bằng mắt thường. Các carbohydrate gồm glucose, lactose, sucrose, maltose, arabinose, manitol, sorbitol,Môi trường thử nghiệm thường chứa 1% đường. Chất chỉ thị Andrade là một dung dịch acid fuchsin có thêm sodium hydroxide. Chỉ thị pH được thêm vào môi trường cơ bản để chỉ dấu cho sự hình thành các acid hữu cơ. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường, ủ ở 37°C trong 18 - 24 giờ. Môi trường đổi thành màu đỏ hồng là do acid được tạo thành được xem là kết quả dương, ngược lại màu vàng đến không màu là do môi trường có tính kiềm, biểu thị cho kết quả âm tính nghĩa là đường không được lên men. Sinh hơi được quan sát thấy được các bọt khí trong ống nghiệm có ống

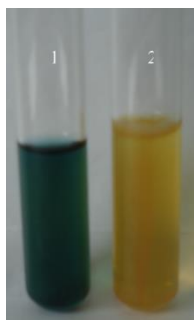


Durham.

Hình 11.6. Kết quả thử nghiệm khả năng sử dụng đường, (1). Đối chứng, (2). Kết quả dương và (3). Kết quả âm.

Tất cả thành viên thuộc họ Enterobacteriaceae lên men glucose, *Salmonella* spp. lên men glucose và mannitol và *E. coli* và *Klebsiella* spp lên men glucose và lactose.

Thử nghiệm oxi hoá - lên men: thử nghiệm oxi hoá - lên men còn gọi là thử nghiệm OF dùng để xác định sự biến dưỡng dạng oxi hoá hay lên men carbohydrate của vi khuẩn.

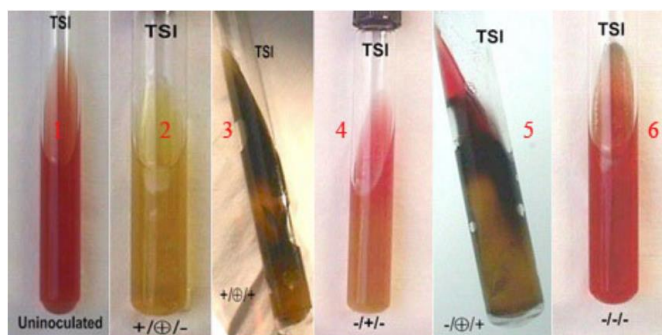


Hình 11.7. Kết quả nghiệm kết quả OF, oxi hóa (O)/lên men (F. (1). Kết quả âm, (2). Kết quả dương.

Thử nghiệm OF được sử dụng để xác định hoặc vi khuẩn có enzyme cần thiết để phân giải glucose trong điều kiện kỵ khí (oxi hoá) và hoặc lên men glucose. Thử nghiệm này dùng để phân biệt họ vi khuẩn Enterobacteriaceae do chúng có khả năng lên men đường với các thành viên khác thuộc họ Pseudomonadaceae, không có khả năng lên men.

Thử nghiệm KIA/TSI: môi trường thạch sắt Kligler có hai đường (KIA) và thạch sắt có ba đường (TSI) được sử dụng để thử nghiệm xác định vi khuẩn lên men carbohydrate đặc trưng được phối chế trong môi trường cơ bản, có hoặc không sinh hơi, cùng với đó là tạo hydrogen sulfide. Môi trường KIA chứa hai carbohydrate là lactose và

glucose với tỷ lệ 10:1. TSI chứa thêm carbohydrate thứ ba thường là saccharose bên cạnh lactose và glucose.



Hình 11.8. Kết quả thử nghiệm trên môi trường thạch sắt có 3 loại đường.
(1). Thử nghiệm kiểm soát (không cấy chủng); **(2).** Glucose dương (+); Lactose và /hoặc Sucrose dương (+); H₂S dương (+) và sinh hơi âm (-). **(3).**

Glucose dương (+); Lactose và /hoặc Sucrose dương (+); H₂S dương (+) và sinh hơi âm (+). **(4).** Glucose dương (+); Lactose và /hoặc Sucrose dương (-); H₂S dương (-) và sinh hơi âm (-). **(5).** Glucose dương (+); Lactose và /hoặc Sucrose dương (-); H₂S dương (+) và sinh hơi âm (+). **(6).** Glucose dương (-); Lactose và /hoặc Sucrose dương (-); H₂S dương (-) và sinh hơi âm (-).

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng que cấy thẳng cấy khuẩn vào ống nghiệm có chứa môi trường thạch nghiêng KIA hoặc TSI theo hai bước, cấy ria trên môi trường thạch nghiêng và cấy thẳng đâm sâu vào trong môi trường thạch, ủ ở 37°C trong 18 - 24 giờ. Trong giai đoạn ủ, trước tiên vi khuẩn sử dụng glucose và sau đó là lactose và saccharose. Sau 18 - 24 giờ, hàm lượng glucose bị cạn kiệt trên phần nghiêng và trong phần đứng. Vi khuẩn bắt đầu oxy hoá phân huỷ peptone trong phần thạch nghiêng tạo ra các sản phẩm phụ có tính kiềm nên làm thay đổi chỉ thị môi trường chuyển sang màu đỏ. Lên men kỵ khí glucose trong phần thạch đứng tạo ra một lượng lớn acid làm trung hoà tính kiềm do phân huỷ peptone. Vì vậy trong phần thạch nghiêng vẫn tiếp tục lưu giữ màu vàng. Màu vàng chỉ thị cho tính acid, biểu thị cho sự lên men các carbohydrate và màu đỏ chỉ thị cho kiềm, không lên men. Sự hiện diện của bọt khí biểu thị cho sản sinh khí trong quá trình lên men các carbohydrate.

Một số vi khuẩn sinh hydrogen sulfite (H₂S), chất này được phát hiện nhờ trầm hiện màu đen ở phần thạch nghiêng và phần thạch đứng của ống nghiệm môi trường. Môi trường sinh hoá này trở nên có màu đen là do sự kết hợp của H₂S với ion sắt từ muối sắt có sẵn trong môi trường để hình thành ferroussulfide trầm hiện màu đen. Ba kiểu lên men

cơ bản này được quan sát trên môi trường KIA sau ủ ở 37°C trong 24 giờ:

(1). Chỉ lên men glucose (phản ứng kiềm/acid hay phản ứng K/A; K biểu thị cho phản ứng kiềm và A biểu thị cho phản ứng acid): sau 18 - 24 giờ do hàm lượng glucosethấp nên hoàn toàn cạn kiệt và vi khuẩn bắt đầu sử dụng peptone có trong môi trường này làm cho phần thạch nghiêng chuyển sang pH kiềm có màu đỏ. Trong phần thạch đứng, tồn tại màu vàng là do phân giải kỵ khí glucose.

(2). Lên men lactose và glucose (phản ứng acid/acid hay A/A): lactose có nồng độ gấp 10 lần glucose. Khi ủ từ 18 - 24 giờ, lactose không bị cạn kiệt vì vậy acid vẫn còn tồn tại trong phần thạch đứng và thạch nghiêng.

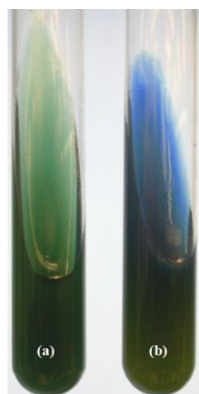
(3). Lên men hoặc lactose hoặc glucose (phản ứng kiềm/kiềm hay K/K): nhiều trực khuẩn Gram âm, không phải đường ruột thì không có khả năng lên men glucose hay lactose. Phản ứng K/K là kết quả vi khuẩn biến dưỡng hiếu khí peptone. Việc sản sinh ra H₂S và kiểu lên men carbohydrate thường biểu thị cho nhóm vi khuẩn đặc trưng nhất là Enterobacteriaceae.

Thử nghiệm urease: thử nghiệm urease được sử dụng để xác định khả năng vi sinh vật phân cắt urea thành ammonia nhờ enzyme urease. Sự sản sinh ra ammonia làm cho môi trường trở nên kiềm hoá; theo đó chỉ thị phenol red thay đổi từ màu đỏ sang màu hồng. Thử nghiệm này được tiến hành trong môi trường Christensen's urease. Môi trường này được cấy vi khuẩn và ủ ở 37°C. Vi khuẩn có enzym urease sẽ làm cho màu của môi trường chuyển sang màu hồng.

Thử nghiệm urea dùng để sàng lọc các vi khuẩn có enzyme urease gồm *Proteus* spp., *Morganella* spp., và một số *Providencia* spp. *Proteus* spp. cho phản ứng urea dương tính trong vòng 6 giờ. Một ví dụ khác về vi khuẩn sinh urease là *Helicobacter Pylori*, sản sinh ra enzyme này thì cần thiết để các chủng vi khuẩn này tồn tại trong dạ dày có pH thấp.

Thử nghiệm citrate: thử nghiệm citrate được sử dụng để chứng minh khả năng vi khuẩn sử dụng citrate như là nguồn carbon cho sự biến dưỡng. Môi trường lỏng Koser's citrate và môi trường rắn Simmon's citrate được sử dụng cho thử nghiệm này. Trong phép thử này, khuẩn được cấy vào môi trường sau đó ủ ở 37°C qua đêm. Sự tăng trưởng của vi

khuẩn trên môi trường Simmon's citrate kèm theo là pH tăng làm thay đổi màu của môi trường từ màu xanh lá cây ban đầu sang màu xanh da trời đậm. Kết quả vi khuẩn tăng trưởng làm màu môi trường chuyển sang màu xanh da trời là dương tính; khi không có sự tăng trưởng sẽ không có bất kỳ sự thay đổi màu sắc nào của môi trường là kết quả âm tính.



Hình 11.9. Kết quả thử nghiệm khả năng sử dụng citrate của vi khuẩn (a). Kết quả âm, (b). Kết quả dương.

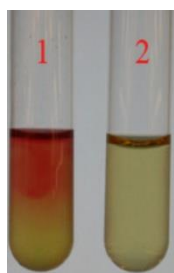
Thử nghiệm phenylalanine deaminase: thử nghiệm phenylalanine deaminase là kiểm tra vi khuẩn có khả năng khử nhóm amin của phenylalanine thành phenylpyruvic acid (PPA), chất này phản ứng với muối sắt cho kết quả có màu xanh. Thử nghiệm này cũng được gọi phép thử PPA. Thử nghiệm PPA này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường có phenylalanine. Sau đó ủ qua đêm ở 37°C, thêm một vài giọt 10% dung dịch chloride sắt vào môi trường có khuẩn. Nếu PPA được tạo ra, môi trường sẽ có màu xanh lá cây do sự kết hợp của ferric chloride với PPA, cho kết quả dương tính. Khi không có sự thay đổi màu sắc là kết quả âm tính. Vi khuẩn có PPA dương là *Proteus spp.*, *Providencia spp.* và *Morganella spp.*

Thử nghiệm khử nitrate: thử nghiệm khử nitrate được sử dụng để xác định sự hiện diện của enzyme nitrate reductase có trong vi khuẩn. Enzyme này khử nitrate thành nitrite hoặc khí nitrogen tự do. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường lỏng có potassium nitrate (KNO_3) 1% và ủ ở 37°C sau 5 ngày. Sau đó thêm 1 - 2 giọt thuốc thử gồm hỗn hợp 1 mL naphthylamine và 1 mL sulfanilic acid. Màu đỏ xuất hiện trong vòng vài phút là kết quả dương tính, không có màu xuất hiện là âm tính. Thử nghiệm khử nitrate chủ yếu được sử dụng để xác định họ Enterobacteriaceae, họ này thường cho kết quả dương với phép thử.

Thử nghiệm methyl red: thử nghiệm methyl red (MR) dùng để phát hiện khả năng vi khuẩn sản sinh và duy trì acid bền vững trong quá trình lên men glucose, tính acid của môi trường nuôi cấy được duy trì bền vững ở pH dưới 4,5. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường lỏng có glucose phosphate và ủ ở 37°C trong 2 - 5 ngày. Sau đó thêm 5 giọt dung dịch MR 0,04% vào môi trường đã cấy

khuẩn, đọc liền kết quả. Sau khi nhỏ thuốc thử nếu môi trường xuất hiện màu đỏ là kết quả dương và màu vàng là kết quả âm tính. *E. coli*, *Yersinia* spp. và *Listeriamonocytogenes* là những ví dụ về vi khuẩn cho kết quả thử nghiệm MR dương. Lưu ý rằng nếu thử nghiệm MR được tiến hành quá sớm, kết quả có thể cho phản ứng dương tính giả. Điều này là bởi vì vi khuẩn có MR âm có thể không có đủ thời gian để biến dưỡng hoàn toàn các sản phẩm acid ban đầu được tạo ra trong quá trình lên men glucose. Thử nghiệm methyl red thường được sử dụng để phân biệt *E. coli* có MR⁺ với *Enterobacter* có MR⁻ và *Yersinia* spp. có MR⁺ với vi khuẩn Gram âm không phải là vi khuẩn đường ruột có MR⁻.

Thử nghiệm Voges – Proskauer: thử nghiệm Voges – Proskauer (VP) được sử dụng để phát hiện acetyl methylcarbinol còn gọi acetoin, một sản phẩm tự nhiên được hình thành từ pyruvic acid trong quá trình lên men glucose. Khi acetoin hiện diện trong môi trường kiềm và có oxygen từ không khí sẽ bị oxi hoá thành diacetyl, chất này phản ứng với alpha-naphthol để tạo thành màu đỏ. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy vi khuẩn vào trong môi trường lỏng có glucose phosphate và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó thêm khoảng 3 giọt alpha-naphthol và thêm 1 giọt potassium hydroxide 40%. Thuốc thử được trộn đều và giữ trong 30 phút. Kết quả dương khi màu hồng xuất hiện



trong 2 - 5 phút. Trong 30 phút, nếu không xuất hiện màu thử nghiệm được cho là âm tính. *Staphylococcus* spp., *V. cholerae* kiểu sinh học Eltor, *Klebsiella* spp. và *Enterobacter* spp. là những vi khuẩn cho kết quả VP dương.

Hình 11.10. Kết quả thử nghiệm Voges - Proskauer (VP), (1). Kết quả dương, (2). Kết quả âm.

Thử nghiệm Indole, MR, VP và citrate thường được xem là thử nghiệm IMViC, là thử nghiệm được sử dụng phổ biến nhất trong xác định vi khuẩn đường ruột, Gram âm.

Tạo hydrogen sulfide: các thử nghiệm này được tiến hành để chứng minh H₂S được một số vi khuẩn tạo ra. Thử nghiệm H₂S được thực hiện bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường có acetate chì, ferric ammonium citrate hay ferrous acetate và ủ qua đêm ở 37°C. Vi khuẩn sinh H₂S là nhờ hoạt động của enzyme của chúng tạo H₂S từ các amino

acid có sulfur hiện diện trong môi trường. Sự sản sinh ra sulfur sẽ làm môi trường có màu đen, thấy được bằng mắt thường.

Sử dụng giấy lọc là một phương pháp khác để chứng minh H_2S được tạo ra. Trong phương pháp này, mảnh giấy lọc được nhúng với acetate chì sau đó kẹp với môi trường có khuẩn. Khi có H_2S sẽ làm cho giấy chuyển sang màu đen. *P. mirabilis*, *P. vulgaris* và *Salmonella* spp. là những ví dụ về vi khuẩn sinh H_2S .

11.2.4. Cấu trúc kháng nguyên

Sự ngưng kết của vi khuẩn với các kháng huyết thanh đặc trưng sẽ tạo thuận lợi cho việc định danh sâu hơn vi khuẩn được phân lập. Thử nghiệm ngưng kết với kháng huyết thanh được sử dụng trong định danh các chủng vi khuẩn phân lập gây bệnh giả định như *Salmonella*, *Vibrio cholera*, Thử nghiệm ngưng kết với kháng huyết thanh cũng được sử dụng để phân nhóm *Streptococcus* tiêu huyết beta.

11.2.5. Tính gây bệnh cho động vật

Một số vi khuẩn gây bệnh và sản phẩm biến dưỡng của chúng sẽ gây ra các bệnh đặc trưng cho vật nuôi ở phòng thí nghiệm. Các động vật thường được sử dụng phổ biến nhất là chuột, chuột lang và thỏ. Phụ thuộc vào vi khuẩn thử nghiệm mà có thể cấy chúng vào dưới da, vào trong cơ, trong tĩnh mạch, màng bụng hay trong não của động vật thử nghiệm. Việc định danh vi khuẩn phụ thuộc vào dấu hiệu xuất hiện trên tử thi và đặc điểm của vi khuẩn nuôi cấy. Ví dụ chuột lang thường được sử dụng phổ biến trong thử nghiệm xác định tính gây bệnh ở động vật do các loài vi khuẩn *C. diphtheriae*, *Clostridium perfringens* và *M. tuberculosis* gây ra.

11.2.6. Nhạy cảm với kháng sinh

Chứng minh tính nhạy cảm với kháng sinh của một chủng vi khuẩn phân lập thì cần thiết để đưa ra liệu pháp kháng sinh thích hợp. Trong một số trường hợp, tính nhạy cảm với một kháng sinh cụ thể sẽ giúp ích cho định danh, ví dụ *Streptococcus pyogenes* thì nhạy cảm với bacitracin và *Streptococcus pneumoniae* nhạy với optochin. Tính nhạy cảm với kháng sinh có thể được xác định bằng thử nghiệm đĩa khuếch tán, thử nghiệm dây pha loãng nồng độ và thử nghiệm E-test.

11.2.7. Phân kiểu (typing) chủng vi khuẩn

Khả năng phân biệt giữa các chủng vi khuẩn tương tự nhau có thể là đặc điểm quan trọng để truy tìm dấu vết hay kiểu lây nhiễm trong cộng đồng. Phương pháp phân kiểu được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu dịch tễ học. Phương pháp phân kiểu gồm (a) kỹ thuật về kiểu hình và (b) kỹ thuật về kiểu gen.

Kỹ thuật về kiểu hình: kỹ thuật về kiểu hình phụ thuộc vào các đặc điểm của vi khuẩn quan sát được. Chi tiết được trình bày như sau: (i). Phân kiểu sinh học, (ii). Phân kiểu huyết thanh, (iii). Phân kiểu bacteriocin, (iv). Phân kiểu phage.

Phân kiểu sinh học: kỹ thuật này dựa vào bộ quy tắc các phản ứng sinh hóa để phân biệt các chủng với nhau trong cùng một loài cụ thể. Thử nghiệm nhạy cảm với kháng sinh là một ví dụ về kiểu này.

Phân kiểu huyết thanh: sự khác nhau giữa các chủng trong cùng một loài có thể được phân biệt dựa trên sự khác nhau về biểu hiện yếu tố quyết định kháng nguyên trên bề mặt tế bào vi khuẩn.

Phân kiểu bacteriocin: được sử dụng trong trường hợp loài vi khuẩn mà số lượng thực khuẩn thể gây tan đã được xác định.

Phân kiểu phage: kỹ thuật này chủ yếu dùng để phân biệt chủng vi sinh vật và được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu dịch tễ học.

Kỹ thuật về kiểu gen: kỹ thuật về kiểu gen phụ thuộc vào mối quan hệ của bộ gen vi khuẩn. Kỹ thuật về kiểu gen được tiến hành để phân biệt các chủng vi khuẩn khác nhau gồm phân tích hồ sơ plasmid và phân tích enzyme cắt giới hạn endonuclease của DNA nhiễm sắc thể.

11.2.8. Phương pháp định danh nhanh

Phát hiện nhanh vi sinh vật gây bệnh và các vi sinh ô nhiễm khác trong thực phẩm và bệnh phẩm là vấn đề cần thiết. Phương pháp truyền thống để phát hiện vi sinh vật gây bệnh thường mất nhiều thời gian để vi khuẩn tăng trưởng trên các môi trường tăng sinh, phân lập, làm thuần, thử nghiệm sinh hoá và đôi khi là huyết thanh. Hiện nay với tiến bộ khoa học kỹ thuật giúp phát hiện và định danh nhanh hơn, thuận lợi hơn, nhạy hơn và chuyên biệt hơn so với phương pháp truyền thống, ít nhất là về mặt lý thuyết. Những phương pháp mới này được gọi là phương pháp nhanh. Phương pháp nhanh là hàng loạt

các thử nghiệm gồm sử dụng các chế phẩm sinh hoá thu nhỏ lại (Bảng 11.1), thử nghiệm dựa trên kháng thể và DNA và các phương pháp biến đổi từ phương pháp truyền thống nhằm đẩy nhanh các bước phân tích. Một số trong những phương pháp nhanh này đã được tự động hoá nhằm giảm bớt các thao tác bằng tay. Với một số ít ngoại trừ, hầu hết các phương pháp nhanh được sử dụng để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh đặc trưng trong thực phẩm đòi hỏi phải vi sinh vật phải tăng trưởng trên môi trường tăng sinh trước khi phân tích.

Bảng 11.1. Chế phẩm sinh hóa dạng thu nhỏ và hệ thống tự động để định danh vi khuẩn gây bệnh.

Hệ thống	Sản phẩm	Nhà sản xuất	Vi sinh vật
API	Sinh hóa	bioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , vi khuẩn kỵ khí, không lên men, <i>Campylobacter</i> , <i>Staphylococcus</i>
Cobas IDA	Sinh hóa	Hoffmann LaRoche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Micro-ID	Sinh hóa	REMEL	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i>
EnterotubeII	Sinh hóa	Roche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Spectrum 10	Sinh hóa	Austin Biological	<i>Enterobacteriaceae</i>
RapID	Sinh hóa	Innovative Diag.	<i>Enterobacteriaceae</i>
BBL Crystal	Sinh hóa	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , vi khuẩn kỵ khí, không lên men
Minitek	Sinh hóa	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i>
Microbact	Sinh hóa	Microgen	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn không lên men
Vitek	Sinh hóa	bioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i> , vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương
Microlog	C oxidation ^a	Biolog	<i>Enterobacteriaceae</i> , vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương
MIS	Acid béo ^a	Microbial-ID	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>
Walk/Away	biochemical ^a	MicroScan	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>
Replianalyzer	biochemical ^a	Oxoid	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>

Riboprinter	nucleic acid ^a	Qualicon	<i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Escherichia coli</i>
Cobas Micro-ID	biochemical ^a	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> , vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn không lên men
Malthus	conductance ^a	Malthus	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , coliforms
Bactometer	impedance ^a	bioMerieux	<i>Salmonella</i>
^a Hệ thống tự động			

Ngày nay nhiều phương pháp tự động đã được triển khai mang tính thương mại, theo đó chỉ cần mất một vài giờ để xác định đặc điểm của chủng phân lập. Các kỹ thuật này gồm phát hiện enzyme chuyên biệt, độc tố, kháng nguyên hay sản phẩm biến dưỡng của vi khuẩn. Vi khuẩn kỵ khí có thể được xác định bằng các sử dụng kỹ thuật sắc ký khí lỏng để xác định acid béo chuỗi ngắn mà chúng sinh ra. Thử nghiệm sự ngưng tụ bằng các hạt latex, thử nghiệm đông tụ, sử dụng kháng thể phát huỳnh quang trực tiếp và kỹ thuật miễn dịch dựa enzyme liên kết (ELISA) là những kỹ thuật phổ biến nhất được sử dụng trong phòng thí nghiệm để phát hiện nhanh kháng nguyên của vi sinh vật có trong mẫu vật. Kháng thể đối với một kháng nguyên chuyên biệt gắn kết trong các hạt latex được sử dụng để thử nghiệm sự đông tụ. Một số ví dụ về các sản phẩm này được tóm tắt ở Bảng 11.2.

Bảng 11.2. Danh sách các phương pháp thương mại dựa trên nucleic acid dùng để phát hiện vi sinh vật gây bệnh.

Vi sinh vật	Tên thương mại	Dạng sản phẩm	Nhà sản xuất
<i>Clostridium botulinum</i>	Probelia	PCR	BioControl
<i>Campylobacter</i>	AccuProbe	Mẫu dò	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen
<i>Escherichia coli</i>	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen
<i>E. coli</i> O157:H7	BAX	PCR ^a	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Listeria</i>	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen

	AccuProbe	Mẫu dò	GEN-PROBE
	BAX	PCR	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Salmonella</i>	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen
	BAX	PCR	Qualicon
	BIND	phage	BioControl
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Staphylococcus aureus</i>	AccuProbe	Mẫu dò	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen
<i>Yersinia enterocolitica</i>	GENE-TRAK	Mẫu dò	Neogen

Nguồn: FDA

Hiện nay nhiều phương pháp phân tử như mẫu dò nucleic acid, PCR và các quy trình khuếch đại khác cũng được sử dụng để định danh vi sinh vật. Mẫu dò gen dựa trên sự phát hiện các trình tự DNA hay RNA đặc trưng cho một đối tượng vi sinh vật. Quy trình lai DNA cũng được áp dụng trong phát hiện vi sinh vật có trong mẫu thử. PCR là một kỹ thuật chính được ứng dụng để phát hiện vi sinh vật xâm nhiễm mà kỹ thuật nuôi cấy rất khó khăn để phát hiện, ví dụ virus gây bệnh hoặc nuôi cấy khó thành công ví dụ trực khuẩn gây bệnh Whipple (Bảng 11.3).

Bảng 11.3. Phương pháp thương mại dựa trên kháng thể phát hiện vi sinh vật gây bệnh.

Vi khuẩn/độc tố	Tên thương mại	Dạng sản phẩm	Nhà sản xuất
Độc tố tiêu chảy của <i>Bacillus cereus</i>	TECRA	ELISA	TECRA
	BCET	RPLA	Unipath
<i>Campylobacter</i>	Campyslide	LA	Becton Dickinson
	Meritec-campy	LA	Meridian
	MicroScreen	LA	Mercia
	VIDAS	ELFA	bioMerieux
	EiaFOSS	ELISA	Foss
	TECRA	ELISA	TECRA

Độc tố của <i>C. botulinum</i>	ELCA	ELISA	Elcotech
Độc tố của <i>C. perfringens</i>	PET	RPLA	Unipath
<i>Escherichia coli</i>			
	RIM	LA	REMEL
	<i>E. coli</i> O157	LA	Unipath
	Prolex	LA	PRO-LAB
	Ecolex O157	LA	Orion Diagnostica
	Wellcolex O157	LA	Murex
	<i>E. coli</i> O157	LA	TechLab
	O157&H7	Huyết thanh	Difco
	PetrifilmHEC	Ab-blot	3M
	EZ COLI	Tube-EIA	Difco
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	EHEC-TEK	ELISA	Organon-Teknika
	Assurance	ELISA	BioControl
	HECO157	ELISA	3M Canada
	TECRA	ELISA	TECRA
EHECO157:H7	<i>E. coli</i> O157	ELISA	LMD Lab
	Premier O157	ELISA	Meridian
	<i>E. coli</i> O157:H7	ELISA	Binax
	<i>E. coli</i> Rapitest	ELISA	Microgen
	Transia Card <i>E. coli</i> O157	ELISA	Diffchamb
	<i>E. coli</i> O157	EIA/capture	TECRA
	VIP	Ab-ppt	BioControl
	Reveal	Ab-ppt	Neogen
	Quix Rapid O157	Ab-ppt	Universal
			HealthWatch
	ImmunoCardSTAT	Ab-ppt	Meridian
	VIDAS	ELFA	bioMerieux
	EiaFOSS	ELISA	Foss
Độc tố Shiga (Stx)	VEROTEST	ELISA	MicroCarb

	Premier EHEC Verotox-F	ELISA RPLA	Meridian Denka Seiken
ETEC			
Độc tố không bền nhiệt (LT)	VET-RPLA	RPLA	Oxoid
Độc tố bền nhiệt (ST)	E. coli ST	ELISA	Oxoid
	Microscreen	LA	Microgen
	Listeria Latex	LA	Microgen
	Listeria-TEK	ELISA	Organon Teknika
	TECRA	ELISA	TECRA
	Assurance	ELISA	BioControl
	Transia Plate Listeria	ELISA	Diffchamb
	Pathalert	ELISA	Merck
<i>Listeria</i>	Listertest	Ab-beads	VICAM
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	VIP	Ab-ppt	BioControl
	Clearview	Ab-ppt	Unipath
	RAPIDTEST	Ab-ppt	Unipath
	VIDAS	ELFA	bioMerieux
	EiaFOSS	ELISA	Foss
	UNIQUE	Capture-EIA	TECRA
	Bactigen	LA	Wampole Labs
	Spectate	LA	Rhone-Poulenc
	Microscreen	LA	Mercia
	Wellcolex	LA	Laboratoire Wellcome
<i>Salmonella</i>	Serobact	LA	REMEL
	RAPIDTEST	LA	Unipath
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	Screen	Ab-beads	VICAM
	CHECKPOINT	Ab-blot	KPL

	1-2 Test	diffusion	BioControl
	SalmonellaTEK	ELISA	Organon Teknika
	TECRA	ELISA	TECRA
	EQUATE	ELISA	Binax
	BacTrace	ELISA	KPL
	LOCATE	ELISA	Rhone-Poulenc
	Assurance	ELISA	BioControl
	Salmonella	ELISA	GEM Biomedical
	Transia Plate Salmonella Gold	ELISA	Diffchamb
	Bioline	ELISA	Bioline
	VIDAS	ELFA	bioMerieux
	OPUS	ELISA	TECRA
	PATH-STIK	Ab-ppt	LUMAC
	Reveal	Ab-ppt	Neogen
	Clearview	Ab-ppt	Unipath
	UNIQUE	Capture-EIA	TECRA
<i>Shigella</i>	Bactigen	LA	Wampole Labs
	Wellcolex		Laboratoire Wellcome
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphyloslide	LA	Becton Dickinson
	AureusTest	LA	Trisum
	Staph Latex	LA	Difco
	<i>S. aureus</i> VIA	ELISA	TECRA
Độc tố đường ruột	SET-EIA	ELISA	Toxin Technology
	SET-RPLA	RPLA	Unipath
	TECRA	ELISA	TECRA
	Transia Plate SE	ELISA	Diffchamb
	RIDASCREEN	ELISA	R-Biopharm
	VIDAS	ELFA	bioMerieux
	OPUS	ELISA	TECRA

	choleraSMART	Ab-ppt	New Horizon
	bengalSMART	Ab-ppt	New Horizon
<i>Vibrio cholera</i>	choleraScreen	Agglutination	New Horizon
	bengalScreen	Agglutination	New Horizon
Độc tố đường ruột	VET-RPLA	RPLA	Unipath

Nguồn: FDA

11.3. Phân loại vi khuẩn

Phân loại vi khuẩn có thể được định nghĩa như là sự sắp xếp vi khuẩn thành các nhóm phân loại gọi là đơn vị phân loại (taxon) dựa trên đặc điểm giống và khác nhau về kiểu hình và kiểu gen của chúng. Cách tiếp cận này cho phép xếp nhóm phù hợp và hệ thống hoá vi sinh vật.

Mặc dù không có hệ thống phân loại vi khuẩn được chấp nhận như là hệ thống vạn năng, nhưng ba cách tiếp cận chính sau đây thường được sử dụng. Đó là (a) các tiếp cận theo phát sinh chủng loài, (b) phân loại theo Adansonian, và (c) phân loại di truyền.

11.3.1. Phân loại vi khuẩn theo cách tiếp cận phát sinh chủng loài

Phân loại theo cách tiếp cận phát sinh chủng loài là một kiểu phân loại phân tầng, miêu tả kiểu sắp xếp giống như cây phân nhánh, một đặc trưng được sử dụng sự phân chia tại mỗi nhánh hoặc cấp phân loại. Nó được gọi là phân loại theo cách tiếp cận phát sinh chủng loài là bởi vì phương pháp này biểu thị cho sự sắp xếp tiến hoá của loài.

Cách thức phân loại này nhóm các kiểu có quan hệ tiến hoá lại với nhau. Kiểu phân loại này phân chia thành Ngành (Division), Lớp (Class), Bộ (Order), Họ (Family), Tông (Tribe), giống (Genus) và loài (Species). Một số đặc tính quan trọng đặc biệt như đặc điểm nhuộm Gram, lên men lactose, hình thành bào tử, ... được sử dụng phân biệt các nhóm vi khuẩn chính, ngược lại các đặc điểm ít quan trọng hơn như nhu cầu về dinh dưỡng cho sự tăng trưởng của vi khuẩn, việc sản sinh một số enzyme do vi khuẩn, ... được sử dụng để phân biệt các nhóm chính như giống và loài.

Ví dụ vị trí phân loại của *E. coli* có thể được mô tả như sau: Ngành: Protophyta, Lớp: Schizomycetes, Bộ: Eubacteriales, Họ: Enterobacteriaceae, Tông: Escherichiae, Giống: *Escherichia*, Loài: *coli* (Bảng 11.4).

Sổ tay phân loại học về vi khuẩn "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" là bộ tài liệu công bố đáng tin cậy mô tả phân loại phả hệ vi khuẩn. Sổ tay này là bộ tài liệu hữu dụng trong việc gọi tên và mô tả vi khuẩn. Bộ tài liệu này được xem là sách tham khảo tiêu chuẩn và được chấp nhận trên toàn thế giới. Bộ sách này cực kỳ hữu dụng để định danh các kiểu vi khuẩn mới. Số lượng tối thiểu các đặc điểm quan trọng như hình thái vi khuẩn, đặc điểm nhuộm, đặc điểm nuôi cấy, phản ứng sinh hoá, cấu trúc kháng nguyên và tỷ lệ guanine trên cytosine của DNA, ... được sử dụng để định danh và phân loại vi khuẩn.

Bảng 11.4. Vị trí phân loại của *Escherichia coli*.

Ngành	Protophyta
Lớp	Schizomycetes
Bộ	Eubacteriales
Họ	Enterobacteriaceae
Tông	Escherichiae
Giống	<i>Escherichia</i>
Loài	<i>coli</i>

11.3.2. Phân loại theo Adansonian

Phân loại theo Adansonian không thừa nhận phát sinh loài (phylogenetic assumption), nhưng xem xét tất cả các đặc điểm biểu hiện tại thời điểm nghiên cứu. Vì vậy cách phân loại này được gọi là hệ thống phonetic. Hệ thống phân loại Adansonian được Michael Adanson đề xuất đầu tiên vào thế kỷ mười chín. Hệ thống phân loại này đưa ra khái niệm trọng lượng tương đương cho tất cả các đặc tính đo được và các nhóm vi khuẩn dựa trên sự tương đồng về một số đặc điểm.

Hiện nay công cụ máy tính đã tạo điều kiện thuận lợi để mở rộng phạm vi của hệ phân loại phonetic bằng cách cho phép so sánh một lượng rất lớn các đặc điểm của một số sinh vật tại cùng thời điểm. Phân tích máy tính một lượng lớn các đặc điểm của một vi khuẩn tạo điều kiện thuận lợi để định danh một số phân nhóm rộng của các chủng vi khuẩn từ đó phân nhóm sâu hơn nữa trong loài vi khuẩn. Kiểu phân loại này dựa trên đặc tính của một số lượng lớn được gọi là phân loại theo số (numerical taxonomy).

11.3.3. Phân loại di truyền

Phân loại di truyền hay phân loại phân tử được dựa trên sự đồng dạng (homology) của các trình tự DNA thuộc vi sinh vật. Trong phương pháp này trước hết ly trích DNA từ vi sinh vật cần nghiên cứu, sau đó phân tích trình tự DNA bằng thử nghiệm lai DNA hay bằng phương pháp tái tổ hợp. Mức độ lai có thể được đánh giá bằng nhiều phương pháp như sử dụng DNA đánh dấu.

Nghiên cứu RNA thông tin (mRNA) cũng cung cấp thông tin hữu ích về mối quan hệ di truyền giữa các vi khuẩn. Việc phân tích RNA ribosome (rRNA) đem lại giá trị to lớn. Nghiên cứu trình tự nucleotide của RNA ribosome 16S từ các nguồn sinh học khác nhau sẽ chứng minh được mối quan hệ tiến hoá giữa các sinh vật có sự khác biệt lớn và nhờ đó góp phần vào sự hiểu biết các nhóm vi khuẩn mới như cổ khuẩn chẳng hạn. Phân loại di truyền sử dụng ngày càng gia tăng để nghiên cứu cả virus.

11.4. So sánh trình tự sinh học

Trước khi tiến hành so sánh trình tự sinh học trước hết cần phải thu thập dữ liệu về trình tự nucleotide, trình tự bộ gen hay trình tự về ammino acid cần so sánh. Để xác định trình tự nucleotide thường sử dụng phương pháp giải trình tự. Chu trình giải trình tự tự động dựa trên sự phát huỳnh quang cần có một mạch khuôn DNA, mỗi giải trình tự, DNA polymerase bền nhiệt, nucleotide, dNTP và đệm. Nhưng khác với phương pháp của Sanger thay vì sử dụng chất phóng xạ, thì phương pháp giải trình tự tự động sử dụng chất phát huỳnh quang để gắn vào sản phẩm kéo dài và các thành phần được kết hợp với nhau trong một phản ứng bao gồm các bước bắt cặp, kéo dài và biến tính trong máy luân nhiệt. Phản ứng giải trình tự trong chu kỳ nhiệt cao, khuếch đại sản phẩm kéo dài và dừng lại khi lắp ráp một trong bốn ddNTP. Tỷ lệ giữa dNTP với ddNTP được tối ưu để tạo ra số lượng cân bằng các sản phẩm kéo dài có độ dài và ngắn khác nhau.

Chu trình giải trình tự tự động có gắn chất phát huỳnh quang bằng cách sử dụng hoặc dideoxynucleotide triphosphate có gắn chất phát huỳnh quang hoặc mỗi gắn chất phát huỳnh quang. Cả hai dùng bốn chất màu khác nhau. Vì vậy khi nhận được ánh sáng kích thích mỗi chất màu chỉ phát ra một bước sóng duy nhất, chất phát huỳnh quang trên sản phẩm khuếch đại giúp xác định ddNTP ở đầu cuối 3' là A, C, G hay T.

11.4.1. Định dạng FASTA

Để thuận lợi cho quá trình phân tích, nghiên cứu cấu trúc và chức năng bộ gen bằng các phần mềm tin sinh học. Dữ liệu bộ gen cần được chuyển sang định dạng FASTA. FASTA là định dạng được nhiều chương trình phần mềm sử dụng để phân tích và xử lý. Định dạng FASTA đã được David và William mô tả lần đầu tiên vào năm 1985. Theo đó, định dạng FASTA bao gồm một chuỗi mô tả có ký tự đầu tiên là dấu lớn hơn (>), theo sau là chuỗi khai báo dữ liệu dài không quá 80 ký tự và không được có khoảng trắng. Bên dưới là dữ liệu về trình tự sinh học cần cung cấp.

Ví dụ về định dạng FASTA được mô tả như sau:

```
>AaeDNV(M37899)
TATAAGTCCATATTCCATATAAGAAATATTATTTTCGTGATACGGATACTGTAA
GATACAGTTTCTATTAGAAACGATGTATTACATCTGTATCTTACA
```

Trong đó ">AaeDNV(M37899)" là dòng thông tin khai báo, ở trường hợp ví dụ này là tên virus và số hiệu trên Ngân hàng gen, bên dưới là dòng khai báo về đoạn trình tự DNA của virus AaeDNV (*Aedes aegyptidensovirus*).

11.4.2. Phân tích cấu trúc tương đồng bằng công cụ BLAST

BLAST được viết tắt từ cụm từ Basic Local Alignment Search Tool, là một công cụ tìm kiếm cơ sở dữ liệu được đánh giá là cho kết quả nhanh. Công cụ này đang được giới cộng đồng khoa học nghiên cứu về trình tự sinh học sử dụng rộng rãi. Mục đích của công cụ BLAST là nhằm tìm kiếm và so sánh các chuỗi trình tự DNA hay các chuỗi amino acid của các protein khác nhau, cho phép tìm kiếm chuỗi trình tự giống với chuỗi có sẵn mà người tìm kiếm quan tâm. Khi sử dụng công cụ BLAST, một số giá trị được diễn giải như sau:

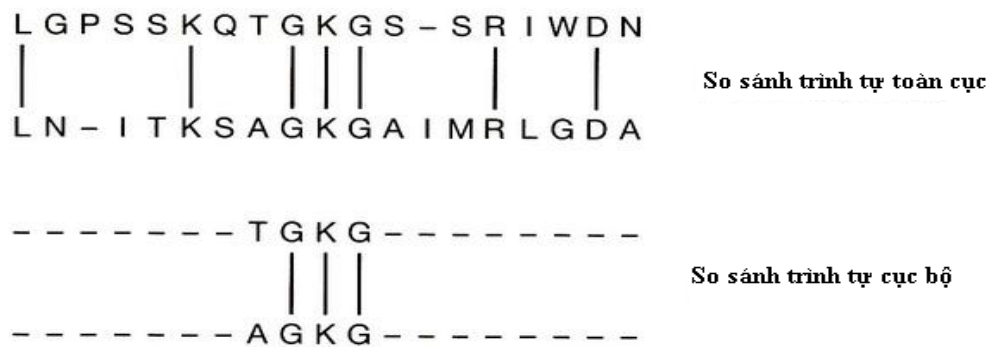
- *Điểm số tối đa (max score)*: là giá trị được tính bằng đơn vị thông tin (bit), dựa trên sự giống nhau giữa các cặp nt của trình tự so sánh với các trình tự khác trong cơ sở dữ liệu. Về nguyên tắc điểm số tối đa tỷ lệ thuận với sự giống nhau giữa hai trình tự.
- *Điểm tổng (total score)*: là điểm số của tất cả các cặp tạo thành điểm cao (high scoring pairs) trong trình tự của cơ sở dữ liệu. Hầu hết giá trị điểm tổng thường

giống giá trị điểm số tối đa.

- *Độ bao phủ truy vấn (query coverage)*: là giá trị biểu hiện mức độ bao phủ về chiều dài của những cặp trình tự được điểm cao trong dữ liệu trình tự tìm kiếm.
- *Độ tương đồng tối đa (maximal identity)*: là giá trị được tính theo tỷ lệ phần trăm cao nhất khi so sánh các cặp dữ liệu.
- *Giá trị E (E value)*: là xác suất khả năng xuất hiện của một trình tự khác có độ tương đồng cao hơn trình tự mà chương trình BLAST đang so sánh. Hay có thể hiểu giá trị E là giá trị thể hiện mức độ tin cậy của giá trị điểm. Thông thường giới hạn của một giá trị tìm kiếm đáng tin cậy khi E nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-5} , nói cách khác giá trị E càng nhỏ thì độ tin cậy càng cao, xác suất để xuất hiện trình tự khác có điểm số cao hơn là càng thấp.

11.4.3. So sánh trình tự sinh học

So sánh trình tự sinh học là quá trình so sánh giữa hai hoặc nhiều chuỗi trình tự nhằm tìm kiếm sự giống nhau giữa các chuỗi ký tự hoặc dạng ký tự của các trình tự DNA, RNA hay các trình tự amino acid.



Hình 11.11. Ví dụ về so sánh trình tự toàn cục và so sánh trình tự cục bộ

Ý nghĩa của so sánh trình tự là nhằm cung cấp thông tin hữu ích về chức năng, cấu trúc và tiến hóa của các trình tự sinh học.

Dấu gạch ngang (-) được gọi là một gap, dưới quan điểm sinh học, gap là biểu hiện của một hoặc nhiều trình tự được chèn vào hoặc bị mất đi trong suốt quá trình tiến hóa do đột biến, sắp xếp lại vật liệu di truyền.

Có hai phương pháp so sánh trình tự: so sánh trình tự toàn cục và so sánh trình tự

cục bộ. So sánh trình tự toàn cục là phép so sánh áp dụng trên toàn bộ chuỗi trình tự. Phép so sánh này thường được áp dụng đối với các trình tự có kích thước tương đương nhau và trình tự có tính tương đồng cao. So sánh theo hướng cục bộ là sự so sánh được tiến hành trên một phần của chuỗi trình tự. Phép so sánh theo hướng cục bộ được áp dụng khi các trình tự khác nhau đáng kể về kích thước và sự tương đồng (Hình 11.8).

11.4.4. Mối quan hệ giữa phân tích tiến hóa và so sánh trình tự

Khi các trình tự acid nucleic hay trình tự amino acid của phân tử protein từ hai sinh vật khác nhau mà tương đồng với nhau thì chúng thường có cùng trình tự tổ tiên chung. So sánh trình tự sẽ cho thấy trình tự bảo tồn và vị trí rẽ nhánh từ trình tự tổ tiên chung.

Việc so sánh giữa hai trình tự sinh học có thể thấy hoặc không thấy được mối quan hệ tiến hóa giữa hai trình tự này. Vì thế cần phải tiến hành so sánh giữa ba hoặc nhiều hơn nữa các trình tự sinh học để đánh giá mối quan hệ tiến hóa.



Hình 11.12. Ví dụ minh họa hai trình tự có cùng trình tự tổ tiên chung.

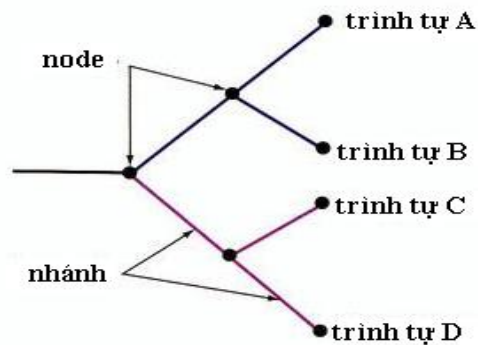
Phép so sánh nhiều trình tự cung cấp các thông tin về vùng trình tự giống nhau trong tập hợp các trình tự đang so sánh. Trong trường hợp protein, các vùng giống nhau thường là trình tự có chức năng bảo tồn hoặc vùng có chức năng cấu trúc. Nếu đã biết trước cấu trúc của một hoặc nhiều trình tự trong tập hợp so sánh thì có thể dự đoán được mối quan hệ tiến hóa giữa trình tự amino acid đang so sánh với các trình tự amino acid của protein khác trong tập hợp.

11.5. Cây phát sinh chủng loài

Cây phát sinh chủng loài hay còn được gọi là cây tiến hóa là một biểu đồ dạng không gian hai chiều, biểu diễn sự tiến hóa của các sinh vật, các trình tự hay các gen từ

các sinh vật khác nhau.

A. Cây cùng gốc



A. Cây không cùng gốc



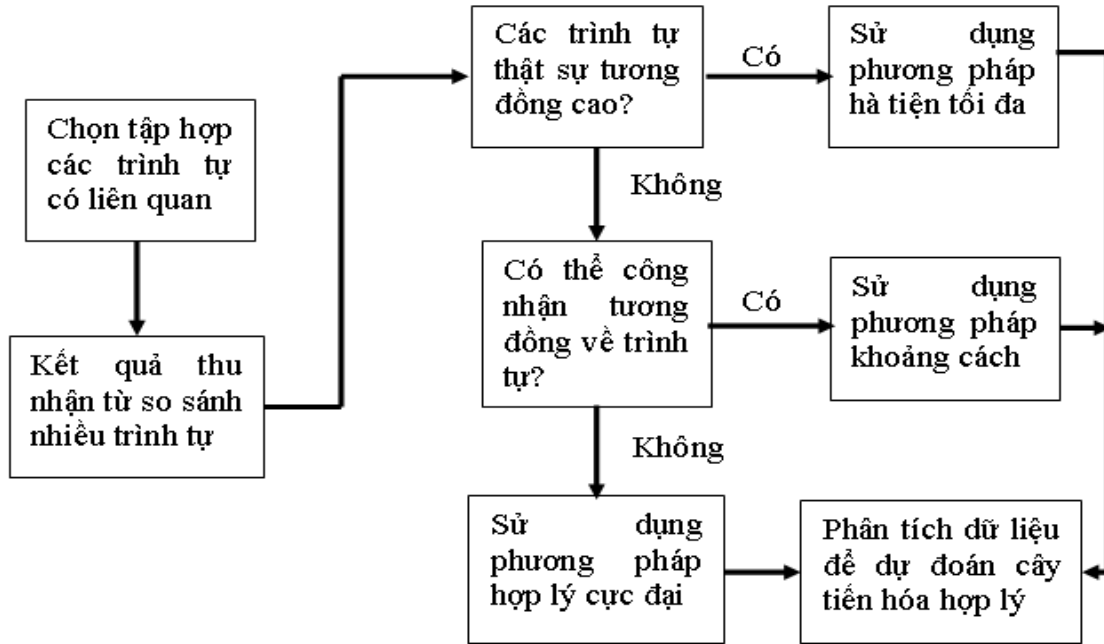
Hình 11.13. Ví dụ minh họa về cấu trúc của các cây tiến hóa

Các trình tự tách biệt được gọi là taxon, taxon được xác định như là đơn vị khoảng cách về địa lý trên cây tiến hóa. Cây tiến hóa được tổ hợp bởi các nhánh bao gồm các taxon và node, nhánh biểu diễn mối quan hệ giữa các taxon. Hình 13 là ví dụ minh họa về cây tiến hóa dạng cùng gốc và không cùng gốc. Theo đó các taxon A và B có nguồn gốc từ trình tự tổ tiên chung với đại diện là node ở bên dưới. Các trình tự A/B và C/D có cùng tổ tiên chung với đại diện là node cuối cùng ở cây cùng gốc.

11.6. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loài

Để xây dựng cây tiến hóa trước tiên cần thu thập các trình tự có liên quan, tiến hành so sánh nhiều trình tự để đánh giá mức độ tương đồng của các trình tự được so sánh để từ đó lựa chọn phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loài một cách hợp lý. Có nhiều cách để xây dựng cây tiến hóa. Hình 14 là tóm tắt cách thức lựa chọn phương pháp xây dựng cây tiến hóa của David Mount gợi ý. Khi các trình tự có sự tương đồng thật sự cao sử dụng phương pháp maximum parsimony và/hoặc maximum likelihood để xây dựng cây tiến hóa. Tuy nhiên sơ đồ tóm tắt của David Mount không phải là một hướng dẫn nghiêm ngặt. Vì vậy khi xây dựng cây tiến hóa cần cố gắng sử dụng ít nhất hai trong ba

phương pháp để có thêm phần tự tin phân tích kết quả trong trường hợp thu được các kết quả giống nhau để nhận định về độ chính xác nhất có thể. Các phương pháp phân tích có thể tìm thấy nhiều hơn một cây tiến hóa đáp ứng các tiêu chí lựa chọn. Các phương pháp thường được sử dụng để xây dựng cây tiến hóa gồm: phương pháp hà tiện tối đa, phương pháp khoảng cách và phương pháp hợp lý cực đại.



Hình 11.14. Tóm tắt cách thức lựa chọn phương pháp xây dựng cây tiến hóa.

11.6.1. Phương pháp hà tiện tối đa

Thiết lập cây tiến hóa khi dữ liệu là trình tự sinh học. Trước hết cần tiến hành phân tích nhiều trình tự để đưa ra các vị trí trình tự tương ứng nhau. Trong so sánh nhiều trình tự, các vị trí này sẽ xuất hiện ở cột thẳng đứng. Tại mỗi vị trí so sánh, các cây phát sinh chủng loài sẽ lựa chọn sự biến đổi tiến hóa thấp nhất để đưa ra những thay đổi trình tự trong dữ liệu quan sát được. Phép phân tích này tiếp tục cho mỗi vị trí trong chuỗi trình tự so sánh. Cuối cùng cây tiến hóa được thiết lập với những thay đổi nhỏ nhất trong số các vị trí trình tự được xác định. Phương pháp này được sử dụng cho những trình tự có kích thước nhỏ và có sự tương đồng cao.

11.6.2. Phương pháp khoảng cách

Được Feng và Doolittle đưa ra đầu tiên vào năm 1996, là nhóm phương pháp tận dụng những thay đổi giữa mỗi cặp trong một nhóm trình tự để đưa ra cây phát sinh chủng loài của nhóm. Các cặp trình tự có ít thay đổi nhất sẽ được gọi là “cặp bên – neighbor”. Trên cây tiến hóa các trình tự này sẽ cùng nhau chia sẻ từ một node hay có vị trí tổ tiên chung. Mục đích của nhóm phương pháp khoảng cách là để xác định cây tiến hóa có các vị trí bên cạnh và độ dài của nhánh chính xác nhằm tái lập lại dữ liệu gốc càng gần nhau càng tốt.

11.6.3. Phương pháp hợp lý cực đại

Được dựa trên hàm toán tính xác suất khả năng cây tiến hóa được tạo thành từ dữ liệu đã được quan sát. Phương pháp hợp lý cực đại cũng có thể sử dụng cho những trình tự tương đồng. Tuy nhiên chúng thường được sử dụng cho các trình tự khác nhau đáng kể về kích thước và sự tương đồng. Điểm thuận lợi của nhóm phương pháp này là cung cấp các kiểu cây tiến hóa để tính toán và đưa ra những thay đổi về trình tự.

11.7. Phân loại trong phạm vi của loài

Phân loại trong phạm vi loài là nỗ lực để phân loại sâu hơn cấp độ loài vi khuẩn dựa đặc điểm sinh học còn gọi là kiểu sinh học (biotype), đặc tính về kháng nguyên còn gọi là kiểu huyết thanh (serotype), tính nhạy cảm với thực khuẩn thể hay kiểu phage (phage type) và việc sản sinh bacteriocin hay kiểu colicin (colicin type). Hiện tại phương pháp phân tử đang được sử dụng ngày càng tăng để phân loại trong phạm vi loài vi sinh vật nhất là được ứng dụng cho virus.

Phương pháp phân tử dùng để phân loại trong phạm vi mức độ loài thường có hai kiểu phổ biến đó là: (a). Phương pháp phân loại theo kiểu hình (phenotype) và (b). Phương pháp phân loại theo kiểu gen (genotype). Phương pháp phân loại theo kiểu hình chủ yếu được dựa trên nghiên cứu về các đặc điểm biểu hiện của vi sinh vật và được tiến hành bằng kỹ thuật phân kiểu điện di (electrophoretic typing) protein vi khuẩn và kỹ thuật thấm miễn dịch (immunoblotting).

Phương pháp kiểu gen bao các phân tích trực tiếp các gen và DNA nhiễm sắc thể và DNA ngoài nhiễm sắc thể. Phương pháp kiểu gen gồm phân tích hồ sơ plasmid, phân tích endonuclease cắt giới hạn của DNA nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật Southern blotting,

PCR và giải trình tự nucleotide.

11.8. Danh pháp vi sinh vật

Danh pháp có liên quan đến việc đặt tên vi sinh vật. Danh pháp vi khuẩn được Ủy ban Quốc tế về Hệ thống vi khuẩn (International Committee on Systematic Bacteriology), phê duyệt và công bố trên tạp chí quốc tế về hệ thống vi khuẩn. Điều này giúp duy trì tính thống nhất khi sử dụng tên vi khuẩn được chấp nhận ở tầm quốc tế. Tương tự như vậy danh pháp và phân loại virus được Ủy ban phân loại học quốc tế về virus quản lý. Có hai kiểu tên thường được sử dụng cho một vi khuẩn cụ thể là tên thường dùng và tên khoa học: (a). Tên thường dùng và (b). Tên khoa học.

Tên thường dùng cho vi sinh vật thì thay đổi từ quốc gia này đến quốc gia khác và thường được gọi bằng ngôn ngữ địa phương. Ví dụ trực khuẩn u lao, trực khuẩn thương hàn, khuẩn cầu lậu là tên thường dùng gắn với hình dạng và đặc tính gây bệnh của vi khuẩn.

Tên khoa học là tên quốc tế được chấp nhận ở tầm thế giới. Nhờ những quy ước được chấp nhận về phân loại học này mà theo đó tên của Bộ vi khuẩn được thêm âm cuối là *ales*, ví dụ bộ Eubacteriales, bộ Spirochaetales; từ cuối của Họ vi khuẩn là *aceae*, ví dụ họ Enterobacteriaceae, họ Spirochaetaceae và Tông có âm cuối là *eae*, ví dụ tông Proteae. Bộ, Họ và Tông bắt đầu với ký tự viết hoa. Tên giống cũng bắt đầu bằng chữ viết hoa ví dụ giống *Escherichia*, giống *Treponema* nhưng tên loài thì bắt đầu bằng chữ thường, ví dụ loài *coli* hay loài *pallidum*. Khi viết trong văn bản, cả tên giống và tên loài được viết cùng nhau dưới dạng in nghiêng hoặc gạch dưới. Tên khoa học của vi khuẩn khi được viết lần đầu tiên thì viết dưới dạng đầy đủ, ví dụ *Escherichia coli*, *Treponema pallidum* nhưng khi đề cập tiếp theo có thể viết ở dạng tắt, ví dụ *E. coli*, *T. pallidum*. Khi vi khuẩn được quy cho cả nhóm thì tên của chúng được viết hoặc ở dạng không chữ hoa, không chữ nghiêng hoặc không gạch dưới, ví dụ vibrios, streptococcus, staphylococcus,