

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Trần Thị Lệ Quyên

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CÁC KỸ THUẬT MỚI ỨNG DỤNG  
ĐỂ PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Burkholderia pseudomallei* TRONG  
CÁC MẪU BỆNH PHẨM LÂM SÀNG VÀ NGOÀI MÔI TRƯỜNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Trần Thị Lệ Quyên

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CÁC KỸ THUẬT MỚI ỨNG DỤNG  
ĐỂ PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Burkholderia pseudomallei* TRONG  
CÁC MẪU BỆNH PHẨM LÂM SÀNG VÀ NGOÀI MÔI TRƯỜNG

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420101.07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: 1. TS. Trịnh Thành Trung  
2. PGS. TS. Bùi Thị Việt Hà

Hà Nội - 2024

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cộng tác cùng các cộng sự khác.

Các số liệu trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý của các đồng tác giả.

Phần còn lại chưa được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tác giả luận án

**Trần Thị Lệ Quyên**

## LỜI CẢM ƠN

*Hoàn thành luận án tiến sĩ là dấu mốc đánh dấu sự trưởng thành của nghiên cứu sinh trong giai đoạn đầu của sự nghiệp nghiên cứu khoa học. Luận án là sự nỗ lực học tập và nghiên cứu của nghiên cứu sinh, sự định hướng khoa học của thầy hướng dẫn, sự hỗ trợ của đồng nghiệp trong phòng thí nghiệm và nhiều nguồn lực khác. Tôi xin bày tỏ sự biết ơn chân thành tới tất cả sự hỗ trợ trực tiếp hay gián tiếp đã giúp tôi hoàn thành luận án này.*

*Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời biết ơn sâu sắc nhất tới TS. Trịnh Thành Trung, thầy hướng dẫn thứ nhất, người đã đưa tôi đến thế giới “melioidosis” bằng kiến thức chuyên môn sâu rộng với tinh thần đầy nhiệt huyết nghiên cứu khoa học. Thầy không chỉ là người thầy hướng dẫn khoa học giúp tôi định hướng các nghiên cứu đáp ứng chất lượng công bố quốc tế, mà còn là người lãnh đạo quan tâm hỗ trợ tôi trong các nhiệm vụ khoa học khác tại đơn vị.*

*Tôi gửi lời cảm ơn tới PGS. TS. Bùi Thị Việt Hà, cô hướng dẫn thứ hai, người đã đồng hành nhiều năm với tôi từ bậc học đại học tới các bậc sau đại học. Cô luôn dành cho tôi sự quan tâm hỗ trợ về chuyên môn, tiếp thêm động lực cho tôi hoàn thành luận án.*

*Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô tham dự Hội đồng đánh giá luận án các cấp, các thầy cô đã dành thời gian đọc, nhận xét và góp ý để luận án của tôi được hoàn thiện hơn.*

*Để hoàn thành được luận án này, tôi chân thành cảm ơn ThS. Bùi Nguyễn Hải Linh, người đồng nghiệp đã hết sức tâm huyết giúp tôi hoàn thành nhiều thí nghiệm của luận án. Tôi cũng gửi lời cảm ơn các anh chị em đồng nghiệp tại Viện Vi Sinh vật và Công nghệ sinh học đã luôn động viên và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận án cũng như trong công việc nghiên cứu.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn các đề tài cấp nhà nước NVQG - 2018/08 và NĐT.82.GB/20 và đề tài cấp ĐHQGHN QG.21.57 đã tài trợ cho nghiên cứu của luận án. Tôi cũng xin cảm ơn sự hỗ trợ của BVĐK tỉnh Hà Tĩnh, BVTW Huế và các bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu.*

*Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của các quý thầy cô tại Bộ môn Vi sinh vật học-Khoa Sinh học, phòng Đào tạo (bộ phận Quản lý sau đại học), trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội về các góp ý chuyên môn cũng như hướng dẫn các thủ tục hành chính để hoàn thành luận án.*

*Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Quỹ VINIF, Vingroup đã hỗ trợ một phần kinh phí cho quá trình thực hiện luận án.*

*Cuối cùng, tôi xin biết ơn sự quan tâm, động viên và tạo điều kiện của gia đình và người thân giúp tôi có thời gian và động lực hoàn thành luận án.*

*Hà Nội, ngày 08 tháng 02 năm 2024*

**Trần Thị Lệ Quyên**

## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	i
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	iii
DANH MỤC BẢNG .....	v
MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. VI KHUẨN <i>Burkholderia pseudomallei</i> VÀ BỆNH NHIỄM TRÙNG MELIOIDOSIS .....	3
1.1.1. Giới thiệu về chi vi khuẩn <i>Burkholderia</i> và loài <i>B. pseudomallei</i> .....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> .....	6
1.1.3. Bệnh nhiễm trùng melioidosis.....	10
1.1.4. Phân bố vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> và ca nhiễm melioidosis.....	15
1.2. NGHIÊN CỨU VỀ <i>B. pseudomallei</i> VÀ MELIOIDOSIS TẠI VIỆT NAM.....	22
1.2.1. Nghiên cứu về <i>B. pseudomallei</i> .....	22
1.2.2. Nghiên cứu điều tra ca nhiễm melioidosis .....	24
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM VI KHUẨN <i>B. pseudomallei</i> TỪ MẪU BỆNH PHẪM LÂM SÀNG.....	29
1.3.1. Các phương pháp xét nghiệm phụ thuộc nuôi cấy.....	29
1.3.2. Các phương pháp xét nghiệm không phụ thuộc nuôi cấy.....	35
1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN <i>B. pseudomallei</i> NGOÀI MÔI TRƯỜNG.....	38
1.4.1. Phương pháp nuôi cấy .....	38
1.4.2. Phương pháp sinh học phân tử.....	41
1.5. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN.....	42
1.5.1. Cách tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis.....	42
1.5.2. Các tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật phát hiện vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> .....	45
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	48
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU.....	48

2.1.1. Hóa chất và thiết bị .....	48
2.1.2. Chủng vi khuẩn .....	50
2.1.3. Mẫu huyết thanh .....	51
2.1.4. Mẫu môi trường .....	52
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	56
2.2.1. Kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis.....	56
2.2.2. Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu phát hiện <i>B. pseudomallei</i> ngoài môi trường.	59
2.2.3. Định lượng vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> từ mẫu môi trường .....	64
2.2.4. Phương pháp phân tích đa hình trình tự các kiểu gen MLST.....	64
2.2.5. Thống kê xử lý số liệu .....	65
2.2.6. Sơ đồ nghiên cứu .....	67
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>68</b>
3.1. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM NHANH MELIOIDOSIS TỪ MẪU BỆNH PHẪM LÂM SÀNG .....	68
3.1.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis .....	68
3.1.2. Đánh giá hiệu quả xét nghiệm melioidosis của WC/Hcp1-ELISA .....	78
3.2. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT PHÁT HIỆN <i>B. pseudomallei</i> NGOÀI MÔI TRƯỜNG.....	89
3.2.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy phát hiện vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> ngoài môi trường .....	89
3.2.2. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước trong điều tra sự có mặt của <i>B. pseudomallei</i> ngoài môi trường.....	95
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>110</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>111</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ .....</b>	<b>112</b>
<b>LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....</b>	<b>112</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>113</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AhpC	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	
API	Analytical profile index	
AUROC	Area under the receiver operating characteristics curve	
BV TƯ		Bệnh viện Trung ương
BVĐK		Bệnh viện đa khoa
BSA	Bovine serum albumin	
CDC	Centers for disease control and prevention	Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh
CDS	Coding DNA sequence	Trình tự mã hóa
CFU	Colony forming unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CI	Confidence interval	
CPS	Capsule polysaccharide	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
EM	Erythritol medium	
EPS	Exopolysaccharide	
GIs	Genomic island	Đảo gen
Hcp1	Hemolysin co-regulated protein 1	
ICT	Immunochromatography Test	Xét nghiệm sắc ký miễn dịch
IHA	Indirect hemagglutination assay	Ngưng kết hồng cầu gián tiếp
iiPCR	Insulated isothermal PCR	PCR đẳng nhiệt
IQR	Interquartile range	
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside solution	
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification PCR	PCR khuếch đại đẳng nhiệt vòng lặp
LB	Luria-Bertani broth	
LPS	Lipopolysaccharide	



Maldi-tof MS	Matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry	
MHA	Mueller Hinton agar	
MLST	Multilocus sequence typing	Đa hình trình tự các kiểu gen
MNGC	Multi-nucleated giant cells	Tế bào khổng lồ đa nhân
MQ	Milli-Q	Nước cất Milli-Q
NST		Nhiễm sắc thể
NTDs	Neglected tropical diseases	Các bệnh nhiệt đới mới nổi
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PVDF	Polyvinylidene difluoride	
OPD	O-phenylenediamine dihydrochloride	
RENOMAB	Research network on melioidosis and <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Mạng lưới nghiên cứu về melioidosis và <i>B. pseudomallei</i>
SDS	Sodium dimethyl sulfate	
SDS-PAGE	Sodium dimethyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	
ST	Sequence type	Kiểu trình tự
TBSS-C50	Threonine-basal salt solution colistin 50 mg/liter	
TLTK		Tài liệu tham khảo
TMB	5'5-Tetramethylbenzidine	
TTSS1	Type III secretion system	Hệ thống tiết nhóm III
VSV		Vi sinh vật
VSV&CNSH		Vi sinh vật và Công nghệ sinh học
VTCC	Vietnam type culture collection	Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside	
WC	Whole cell	Toàn tế bào
WHO	World health organization	Tổ chức Y tế thế giới

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Cây phát sinh chủng loại của <i>B. pseudomallei</i> và các loài quan hệ họ hàng. Cây được xây dựng dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các loài nghiên cứu.	5
<b>Hình 1.2.</b> Hình thái tế bào vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> .	6
<b>Hình 1.3.</b> Các dạng hình thái khuẩn lạc vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> trên môi trường thạch Ashdown sau 4 ngày nuôi cấy ở 37°C.	7
<b>Hình 1.4.</b> Dự đoán về tính phù hợp môi trường đối với sự tồn tại của <i>B. pseudomallei</i> .	18
<b>Hình 1.5.</b> Số liệu bài báo Quốc tế công bố về <i>B. pseudomallei</i> và melioidosis tại Việt Nam từ lúc phát hiện ra ca bệnh đầu tiên năm 1925 đến thời điểm kết thúc chiến tranh năm 1975, dư âm ca bệnh công bố sau chiến tranh và những năm hòa bình lập lại.	27
<b>Hình 1.6.</b> Khuẩn lạc vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> và các loài vi khuẩn khác phân lập từ mẫu bệnh phẩm tạp nhiễm trên các môi trường thường quy (Columbia, MacConkey và UTI) và chọn lọc (Ashdown) trong thời gian 1-2 ngày, 37°C.	30
<b>Hình 1.7.</b> Sơ đồ các bước nuôi cấy phân lập phát hiện sự có mặt của vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> ngoài môi trường theo hướng dẫn chuẩn.	40
<b>Hình 2.1.</b> Cấu trúc vector pPSG-IBA3.	49
<b>Hình 2.2.</b> Vị trí thu mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn - Thanh Hóa.	53
<b>Hình 2.3.</b> Vị trí thu mẫu đất và nước tại Sóc Sơn.	55
<b>Hình 2.4.</b> Sơ đồ bố trí thí nghiệm phát triển kỹ thuật nuôi cấy làm giàu để phát hiện vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> ngoài môi trường.	62
<b>Hình 2.5.</b> Sơ đồ các bước nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng.	67
<b>Hình 3.1.</b> Kết quả so sánh trình tự gen <i>BPSL2697</i> mã hóa protein GroEL từ chủng chuẩn <i>B. pseudomallei</i> K96243 và trình tự gen từ vector nhân dòng sử dụng khuôn DNA của chủng <i>B. pseudomallei</i> VTCC 70157.	69
<b>Hình 3.2.</b> Nhân dòng 3 gen mã hóa các kháng nguyên protein.	69
<b>Hình 3.3.</b> Biểu hiện của protein tái tổ hợp Hcp1 (1), GroEL1 (2) và AhpC (3) trên tế bào <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS; sản phẩm tinh sạch của Hcp1 (20,7 kDa) (4);	

GroEL1 (59,1 kDa) (5) và AhpC (22,3 kDa) (6); western blot của protein Hcp1 (7); GroEL1 (8) và AhpC (9) với huyết thanh của bệnh nhân melioidosis. ....	70
<b>Hình 3.4.</b> Giá trị OD <sub>490</sub> của xét nghiệm ELISA sử dụng các kháng nguyên Hcp1, AhpC và GroEL1 ở dải nồng độ 0,05-3,0 µg/mL.....	72
<b>Hình 3.5.</b> Giá trị OD <sub>490</sub> của các xét nghiệm WC/Hcp1/AhpC/GroEL1-ELISA sử dụng bộ 185 mẫu huyết thanh.....	74
<b>Hình 3.6.</b> Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> từ 80 mẫu đất được đánh giá bằng qPCR TTSS1.. ..	91
<b>Hình 3.7.</b> Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> từ 80 mẫu đất được đánh giá bằng phân lập trên thạch Ashdown. ....	93
<b>Hình 3.8.</b> (A) Số mẫu nước dương tính với vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> ở 8 thời điểm lấy mẫu bằng 2 kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp và làm giàu hai bước; (B) Nhiệt độ và lượng mưa trung bình tháng tại tỉnh Thanh Hóa năm 2019.....	98

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> Sự phân nhánh của <i>Burkholderia sensu lato</i> .....	4
<b>Bảng 1.2.</b> Số lượng người Việt Nam bản địa nhiễm melioidosis và kết quả điều trị được công bố trên các tạp chí y khoa.....	26
<b>Bảng 1.3.</b> Số lượng ca melioidosis thực tế và số lượng ca dự báo ở một số quốc gia Đông Nam Á .....	28
<b>Bảng 1.4.</b> Các phương pháp thường quy định danh <i>B. pseudomallei</i> .....	32
<b>Bảng 1.5.</b> Các phương pháp phân tử dùng trong định danh <i>B. pseudomallei</i> .....	34
<b>Bảng 1.6.</b> Các phương pháp sinh học phân tử trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm .....	35
<b>Bảng 1.7.</b> Các kỹ thuật ELISA trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm .....	37
<b>Bảng 1.8.</b> Các loại que test nhanh trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm.....	38
<b>Bảng 1.9.</b> Sự ra đời của các môi trường chọn lọc và đặc hiệu vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> .....	39
<b>Bảng 2.1.</b> Danh mục hóa chất dùng trong nghiên cứu của luận án .....	48
<b>Bảng 2.2.</b> Danh mục các thiết bị dùng trong nghiên cứu của luận án .....	50
<b>Bảng 2.3.</b> Bộ 185 mẫu huyết thanh thu tại BVĐK Bắc Giang, Nghệ An, Hà Tĩnh, Bình Định phát triển kỹ thuật xét nghiệm melioidosis .....	51
<b>Bảng 2.4.</b> Thông tin của 80 mẫu đất dùng cho nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy.....	53
<b>Bảng 2.5.</b> Thông tin mẫu đất và nước thu tại gia đình nạn nhân và khu vực xung quanh .....	54
<b>Bảng 2.6.</b> Thông tin về các cặp môi của 3 gen mã hóa kháng nguyên protein .....	57
<b>Bảng 2.7.</b> Thành phần môi trường TBSS-C50 cơ bản .....	59
<b>Bảng 2.8.</b> Thành phần dung dịch khoáng .....	60
<b>Bảng 2.9.</b> Thành phần môi trường làm giàu EM cơ bản .....	60
<b>Bảng 2.10.</b> Môi trường thạch Ashdown .....	61
<b>Bảng 2.11.</b> Trình tự môi và đầu dò của real-time PCR TTSS1 .....	64
<b>Bảng 2.12.</b> Trình tự môi và kích thước dự đoán 7 house-keeping gene.....	65
<b>Bảng 2.13.</b> Công thức tính độ nhạy và đặc hiệu của xét nghiệm .....	66
<b>Bảng 3.1.</b> So sánh hàm lượng kháng nguyên dùng cho xét nghiệm ELISA trong nghiên cứu của luận án với các công bố trước .....	72
<b>Bảng 3.2.</b> Giá trị OD <sub>490</sub> của các xét nghiệm WC/Hcp1/AhpC/GroEL1-ELISA sử dụng bộ 185 mẫu huyết thanh .....	73
<b>Bảng 3.3:</b> Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA sử dụng 4 loại kháng nguyên.....	75
<b>Bảng 3.4.</b> Độ nhạy và đặc hiệu của xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1- ELISA đánh giá trên bộ 185 mẫu huyết thanh.....	75

<b>Bảng 3.5.</b> So sánh giá trị cut-off OD <sub>490</sub> , độ nhạy và độ đặc hiệu của 3 xét nghiệm ELISA trong nghiên cứu của luận án với các công bố trước .....	77
<b>Bảng 3.6.</b> Kết quả xét nghiệm ELISA mẫu huyết thanh thu thập tại BV TƯ Huế dương tính với melioidosis.....	79
<b>Bảng 3.7.</b> Các ca dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy dương tính với xét nghiệm ELISA tại BV TƯ Huế .....	79
<b>Bảng 3.8.</b> Số bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng ELISA và bệnh nhân được chỉ định nuôi cấy và không nuôi cấy vi sinh tại BV TƯ Huế.....	80
<b>Bảng 3.9.</b> Kết quả xét nghiệm ELISA mẫu huyết thanh thu thập tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh dương tính với melioidosis .....	81
<b>Bảng 3.10.</b> Các ca dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy dương tính với xét nghiệm ELISA tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh.....	82
<b>Bảng 3.11.</b> Số bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng ELISA và bệnh nhân được chỉ định nuôi cấy và không nuôi cấy vi sinh tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh.....	82
<b>Bảng 3.12.</b> Thông tin 38 bệnh nhân dương tính với WC/Hcp1-ELISA, âm tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy hoặc không chỉ định nuôi cấy .....	83
<b>Bảng 3.13.</b> Thông tin nhóm bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis .....	85
<b>Bảng 3.14.</b> Thông tin nhóm bệnh nhân tử vong .....	86
<b>Bảng 3.15.</b> Thông tin nhóm bệnh nhân khỏe mạnh.....	87
<b>Bảng 3.16.</b> Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu 1 bước được đánh giá bằng qPCR TTSS1.....	90
<b>Bảng 3.17.</b> Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu 2 bước được đánh giá bằng qPCR TTSS1.....	90
<b>Bảng 3.18.</b> Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy làm giàu được đánh giá bằng kỹ thuật nuôi cấy phân lập .....	92
<b>Bảng 3.19.</b> Tần suất bắt gặp vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> và VSV tổng số trong nước ruộng lúa tại 8 thời điểm từ tháng 2-9/2019.....	99
<b>Bảng 3.20.</b> Đa hình trình tự các kiểu gen MLST của các chủng <i>B. pseudomallei</i> đại diện phân lập từ nước ruộng lúa tại Triệu Sơn - Thanh Hóa .....	101
<b>Bảng 3.21.</b> Kết quả nuôi cấy xác định sự có mặt của <i>B. pseudomallei</i> trong đất và nước thu thập tại gia đình nạn nhân và khu vực xung quanh tại thôn Đô Lương, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn, Hà Nội .....	105
<b>Bảng 3.22.</b> Mối tương quan giữa độ sâu lỗ khoan đất và mật độ vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> tại 2 điểm dương tính.....	107

## MỞ ĐẦU

*Burkholderia pseudomallei* là trực khuẩn Gram âm sống hoại sinh trong đất và trong nước ở các vùng nhiệt đới. Loài vi khuẩn này là căn nguyên gây nhiễm trùng melioidosis - bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, có tỉ lệ tử vong cao (>40%) và nhanh. Việt Nam được coi là nước nằm trong tâm điểm lưu hành của melioidosis ở cấp báo động đỏ (cấp cao nhất) trên bản đồ dịch tễ học toàn cầu với dự đoán 10.430 ca nhiễm mỗi năm, trong đó 4.703 ca tử vong. Tuy nhiên, theo số liệu điều tra trong 7 tháng năm 2015 tại 5 bệnh viện ở Bắc Trung Bộ, chỉ có 70 ca nhiễm melioidosis được ghi nhận. Số liệu này phản ánh tỷ lệ phát hiện melioidosis tại nước ta còn rất xa so với số ca nhiễm dự đoán (chỉ bằng khoảng 1,5%).

Trong chẩn đoán melioidosis, nuôi cấy vi sinh được xem là “tiêu chuẩn vàng”. Tuy nhiên, xét nghiệm vi sinh tại các bệnh viện gặp rất nhiều khó khăn và đòi hỏi người xét nghiệm phải được đào tạo và có nhiều kinh nghiệm trong việc nhận dạng khuẩn lạc *B. pseudomallei*. Hơn nữa, xét nghiệm *B. pseudomallei* theo quy trình nuôi cấy và phân loại thường quy thường kéo dài từ 3 đến 5 ngày, trong khi đó các bệnh nhân melioidosis sốc nhiễm khuẩn huyết có thể tử vong trong 48 giờ nhập viện nếu không được điều trị kịp thời và đúng phác đồ kháng sinh. Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết cần phải có các quy trình xét nghiệm nhanh vi khuẩn *B. pseudomallei* để phục vụ cho điều trị bệnh nhân kịp thời.

Bên cạnh đó, do *B. pseudomallei* tồn tại tự nhiên ngoài môi trường nên việc hiểu về dịch tễ học vi khuẩn rất có ý nghĩa với sức khỏe cộng đồng. Hiện nay, hai phương pháp chính được dùng trong điều tra *B. pseudomallei* ngoài môi trường là nuôi cấy phân lập và real-time PCR gen đặc hiệu vi khuẩn *B. pseudomallei*. Trong đó, phương pháp nuôi cấy phân lập theo hướng dẫn chuẩn tuy đã có những thành công trong việc phát hiện *B. pseudomallei* từ đất, nhưng độ nhạy của phương pháp chưa cao và không đồng đều ở các địa điểm nghiên cứu. Trong khi đó, phương pháp real-time PCR cho độ nhạy cao hơn so với nuôi cấy phân lập, nhưng kết quả dương tính chỉ là nhận định ban đầu về khu vực nguy cơ ô nhiễm vi khuẩn mà không thể thay thế cho nuôi cấy phân lập được chủng vi khuẩn vừa để khẳng định sự có mặt

của vi khuẩn ngoài môi trường vừa để phục vụ cho các nghiên cứu về độc lực và dịch tễ học. Vì vậy, việc phát triển phương pháp nuôi cấy phân lập có độ nhạy cao trong điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường vẫn được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu.

Đề tài “**Nghiên cứu phát triển các kỹ thuật mới ứng dụng để phát hiện vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và ngoài môi trường**” được thực hiện nhằm phát triển kỹ thuật mới phục vụ xét nghiệm nhanh melioidosis trong lâm sàng, và điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường với độ nhạy cao.

**Mục tiêu của nghiên cứu:**

- Phát triển và ứng dụng được kỹ thuật miễn dịch xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng.
- Phát triển và ứng dụng được kỹ thuật nuôi cấy có độ nhạy cao để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường.

**Tính mới của luận án:**

- Phát triển thành công kỹ thuật WC/Hcp1-ELISA sử dụng kháng nguyên chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 thuộc ST46 phổ biến ở Việt Nam để xét nghiệm melioidosis ở người Việt có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (trương ứng 98,4% và 95,1%) với thời gian xét nghiệm nhanh dưới 2 giờ. Kỹ thuật được ứng dụng để xét nghiệm melioidosis tại bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Tĩnh và bệnh viện Trung ương Huế.

- Phát triển thành công kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) điều tra *B. pseudomallei* trong đất với tỷ lệ phát hiện cao hơn gần 2 lần so với hướng dẫn chuẩn (TBSS-C50 48 giờ) khi đánh giá bằng real-time PCR TTSS1; cao hơn 6 lần khi đánh giá bằng phân lập trên đĩa thạch Ashdown. Kỹ thuật được ứng dụng điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường tại Triệu Sơn (tỉnh Thanh Hóa) và Sóc Sơn (thành phố Hà Nội).

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. VI KHUẨN *Burkholderia pseudomallei* VÀ BỆNH NHIỄM TRÙNG MELIOIDOSIS

#### 1.1.1. Giới thiệu về chi vi khuẩn *Burkholderia* và loài *B. pseudomallei*

Chi vi khuẩn *Burkholderia* thuộc họ *Burkholderiaceae*, bộ *Burkholderiales*, lớp *Betaproteobacteria*, ngành *Proteobacteria* (Vio et al., 2020). Một trong các loài đầu tiên của chi *Burkholderia* được mô tả là *Burkholderia caryophylli* (trước đây được gọi là *Phytomonas caryophylli*) - gây bệnh thối thân ở thực vật (Dowson, 1929). Năm 1942, loài vi khuẩn này đã được nhà vi sinh vật học người Mỹ là Walter Burkholder phân loại lại vào chi *Pseudomonas* nhóm II với tên gọi là *Pseudomonas caryophylli* (Burkholder, 1942). Sau đó, Walter Burkholder cũng phát hiện và mô tả một loài vi khuẩn là tác nhân gây thối củ hành tây có tên là *Pseudomonas cepacia* (Burkholder, 1950).

Năm 1992, Yabuuchi và cs đã phân loại lại chi *Pseudomonas* nhóm II thành chi *Burkholderia* gồm 7 loài (Yabuuchi et al., 1992). Tên “*Burkholderia*” được đặt để vinh danh nhà vi sinh vật học Walter Burkholder (Yabuuchi et al., 1992). Là những loài đầu tiên thuộc chi *Burkholderia*, *B. pseudomallei* và *B. mallei* là tác nhân gây bệnh cho người và động vật; *B. caryophylli* và *B. gladioli* gây bệnh trên thực vật; loài *B. cepacia* theo mô tả ban đầu là tác nhân gây bệnh thối củ trên hành tây; riêng 2 loài *B. solanacearum* gây bệnh trên thực vật và *B. pickettii* gây bệnh cơ hội trên người sau đó được chuyển sang chi *Ralstonia* (Eberl and Vandamme, 2016). Loài *B. cepacia* sau đó được chỉ định là loài chuẩn thuộc chi này, và được biết đến như là tác nhân gây nhiễm trùng ở bệnh nhân xơ nang và suy giảm miễn dịch (Depoorter et al., 2016).

Những năm sau đó, hệ thống phân loại của chi *Burkholderia* liên tục được cập nhật. Sawana và cs đã sử dụng trình tự gen 16S rRNA của 45 loài thuộc chi *Burkholderia*, và 21 loại protein có độ bảo thủ cao để nghiên cứu sự mất hoặc chèn trình tự bảo thủ (conserved sequence insertions or deletions - CSIs) (Sawana et al., 2014). Kết quả của nghiên cứu cho thấy sự phân tách chi *Burkholderia* thành 2 nhánh chính: nhánh I là chi *Burkholderia* chỉ gồm hơn 30 loài *Burkholderia* có liên



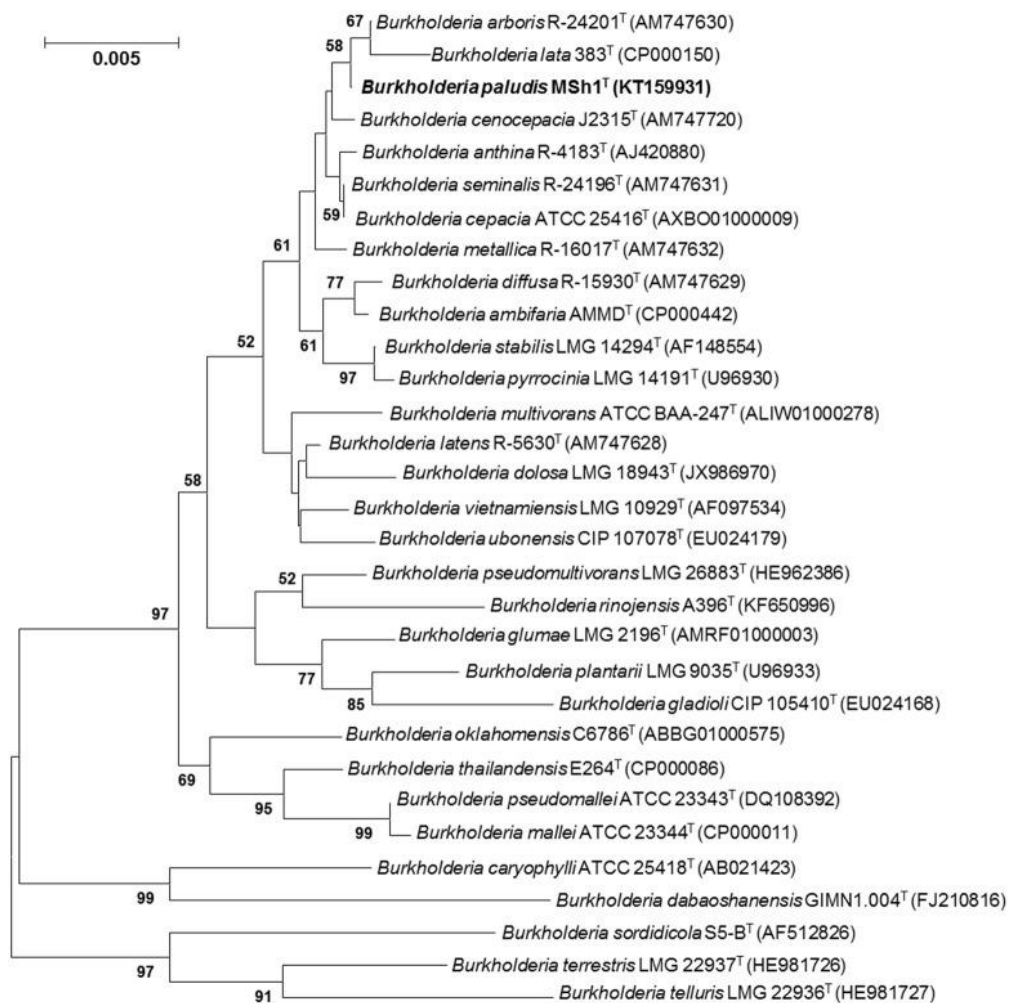
quan đến khả năng gây bệnh trên người, động vật và thực vật; và nhánh II là 74 loài còn lại chủ yếu được phân lập từ môi trường và không được ghi nhận gây bệnh cho các sinh vật bậc cao. Từ đó, chi *Paraburkholderia* đã được đề xuất cho các loài thuộc nhánh II này (Vio et al., 2020) (Bảng 1.1). Tuy nhiên, các quan điểm của giới khoa học trong sự phân chia chi *Burkholderia* còn trái chiều, vì hai nhóm không được phân biệt rõ ràng (Eberl and Vandamme, 2016). Do vậy, Ủy ban Quốc tế về Hệ thống hóa Sinh vật Nhân sơ, Tiểu ban Phân loại *Rhizobium* và *Agrobacterium* gần đây đã nêu ra sự cần thiết phải có một phương pháp tiếp cận thuyết phục hơn để làm sáng tỏ phân loại chi *Burkholderia* (de Lajudie and Young, 2017).

**Bảng 1.1.** Sự phân nhánh của *Burkholderia* sensu lato (Vio et al., 2020)

Nhánh	Số lượng (loài)	Đặc điểm	Phân nhánh	Loài đại diện
<b>I</b> <i>Burkholderia</i> sensu stricto	>30	Có khả năng gây bệnh trên người, động vật và thực vật	Ia	<i>B. cepacia</i> complex
			Ib	<i>B. pseudomallei</i> và các loài có quan hệ họ hàng gần
			Ic	Các loài gây bệnh thực vật như <i>B. glumae</i> và <i>B. gladioli</i>
<b>II</b> <i>Paraburkholderia</i>	>74	Phân lập từ môi trường và không được ghi nhận gây bệnh cho các sinh vật bậc cao	IIa	Các loài <i>Burkholderia</i> sp. chưa được đặt tên
			IIb	Các loài <i>Burkholderia</i> sp. phân lập từ môi trường
			Khác	<i>Burkholderia</i> sp. JPY347 và <i>B. rhizoxinica</i>

Thuộc chi *Burkholderia*, loài *B. pseudomallei* là vi khuẩn gây nhiễm trùng melioidosis - bệnh được Whitmore và Krishnaswami mô tả lần đầu tiên ở Rangoon, Myanmar vào năm 1912 (Whitmore and Krishnaswami, 1912). Do có sự tương đồng về các đặc điểm sinh học với loài vi khuẩn *B. mallei* (trước đây gọi là *Bacillus mallei*) gây bệnh glander, vi khuẩn này đã được đặt tên là *Bacillus pseudomallei*. Trong quá trình phân loại, vi khuẩn này còn được biết đến với nhiều tên khác nhau như *Bacillus whitmorii*, *Malleomyces pseudomallei*, *Pseudomonas pseudomallei* và cuối cùng là *B. pseudomallei* (Yabuuchi et al., 1992). Do độc lực cao, khả năng gây bệnh nguy hiểm cho người và động vật cùng với mối lo ngại về việc lây truyền qua

đường khí dung, *B. pseudomallei* đã được Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (US CDC) phân loại là tác nhân gây khủng bố sinh học ở cấp độ vi sinh vật nguy hiểm loại B (Rotz et al., 2002). Trên cây phát sinh chủng loại, *B. pseudomallei* cùng với 2 loài *B. mallei* và *B. thailandensis* có quan hệ rất gần gũi với nhau (Hình 1.1). Trong khi *B. mallei* ký sinh bắt buộc trên động vật và cũng được CDC xếp vào nhóm tác nhân đe dọa sinh học cấp độ B (Rotz et al., 2002), thì *B. thailandensis* phân bố tự nhiên trong đất và trong nước và không gây bệnh cho người và động vật (Brett et al., 1998).

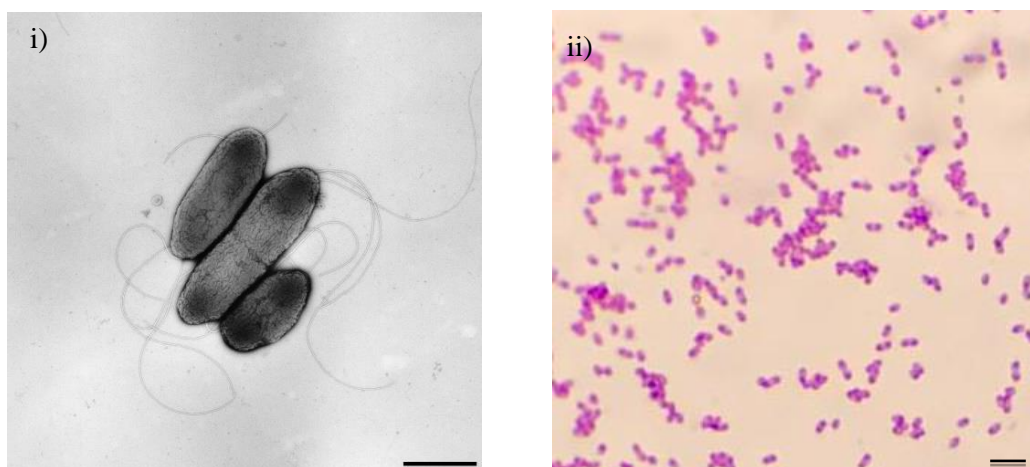


**Hình 1.1.** Cây phát sinh chủng loại của *B. pseudomallei* và các loài quan hệ họ hàng. Cây được xây dựng dựa trên trình tự gen 16S rDNA của các loài nghiên cứu (Ong et al., 2016)

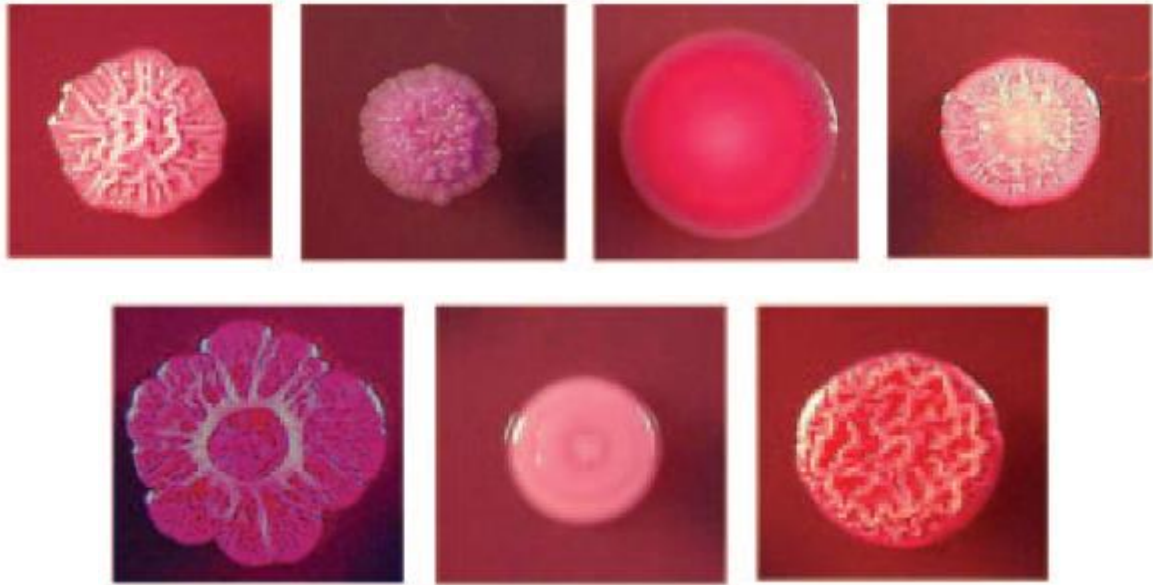
### 1.1.2. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *B. pseudomallei*

#### 1.1.2.1. Đặc điểm hình thái

*B. pseudomallei* là vi khuẩn Gram âm, hình que, kích thước (0,4-0,8) x (2,0-5,0)  $\mu\text{m}$ , bắt màu đậm ở hai đầu khi nhuộm Gram, có khả năng di động nhờ cụm lông roi ở đầu tế bào (Yabuuchi et al., 1992) (Hình 1.2). Hai loại hình thái khuẩn lạc phổ biến thường được quan sát thấy ở vi khuẩn *B. pseudomallei* là dạng khuẩn lạc thô ráp và nhăn mịn (Nicholls, 1930; Chantratita et al., 2007). Thông thường, trên môi trường chọn lọc thạch Ashdown, sau 3-5 ngày nuôi cấy ở 37°C, khuẩn lạc vi khuẩn có màu tím, khô và nhăn. Trên môi trường không chọn lọc, hình thái khuẩn lạc vi khuẩn nhỏ, mịn, ánh kim loại và có mùi đất ải sau 1-2 ngày nuôi cấy. Từ 3-5 ngày, khuẩn lạc trở nên khô, nhăn, từ núm lồi giữa khuẩn lạc tạo thành các gân chạy ra mép khuẩn lạc. Tuy nhiên, cùng một chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể biểu hiện hình thái khuẩn lạc rất đa dạng từ trơn nhẵn đến nhăn nheo và khô ráp (Chantratita et al., 2007) (Hình 1.3).



**Hình 1.2.** Hình thái tế bào vi khuẩn *B. pseudomallei*. i) Hình ảnh tế bào và cụm lông roi được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), bar=1  $\mu\text{m}$  (Hans R. Gelderblom, Gabi Schlier, Rolf Reissbrodt/Robert Koch Institute); ii) Hình ảnh tế bào nhuộm Gram được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100 lần, bar = 5  $\mu\text{m}$  (Bệnh viện Hữu nghị Việt Nam - Cuba Đồng Hới, Quảng Bình, 2017).



**Hình 1.3.** Các dạng hình thái khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* trên môi trường thạch Ashdown sau 4 ngày nuôi cấy ở 37°C (Chantratita et al., 2007).

#### 1.1.2.2. Đặc điểm trao đổi chất

*B. pseudomallei* có phản ứng dương tính với oxidase và sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí (Yabuuchi et al., 1992; Trung et al., 2018). Tuy nhiên, khi có mặt nitrate hoặc arginine, vi khuẩn có thể sống trong điều kiện kỵ khí và sử dụng các chất này làm chất nhận điện tử cuối cùng như các loài vi khuẩn kỵ khí tùy tiện khác (Yabuuchi et al., 1992, Hamad et al., 2011). Bên cạnh đó, vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể sử dụng nhiều nguồn đường khác nhau để sinh trưởng, từ đó có thể thích ứng với nhiều môi trường sống (Yabuuchi et al., 1992). *B. pseudomallei* không có khả năng sử dụng đường L-arabinose, trong khi loài gần gũi là *B. thailandensis* có thể sử dụng nguồn carbon này để sinh trưởng, và ngược lại *B. pseudomallei* có thể đồng hóa được đường erythritol trong khi *B. thailandensis* không có khả năng này (Yabuuchi et al., 1992; Ngamdee et al., 2015).

#### 1.1.2.3. Đặc điểm sinh học phân tử

Bộ gen hoàn chỉnh của chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243 gồm hai nhiễm sắc thể (NST) với kích thước lần lượt là 4,07 Mb và 3,17 Mb tương ứng với 3.460 và 2.395 trình tự mã hóa (coding DNA sequence-CDS). Với kích thước gần 7,3 Mb, bộ gen *B. pseudomallei* được xem là lớn so với bộ gen điển hình của vi sinh vật

nhân sơ. NST 1 mang các “house-keeping gene” (gen thường trực) có chức năng sinh tổng hợp các đại phân tử, chuyển hóa acid amin, tổng hợp chất mang và cofactor, sinh tổng hợp nucleotide và protein, hóa hướng động và khả năng di chuyển. NST 2 chứa các gen mã hóa cho các chức năng phụ trợ như khả năng thích nghi với điều kiện bất lợi, cân bằng nội môi chất sắt, chuyển hóa thứ cấp và điều hòa. Ngoài ra, nhiễm sắc thể 2 còn mang tỉ lệ lớn các CDS liên quan đến các protein giả định hoặc các protein không xác định (Holden et al., 2004).

Truyền gen ngang được xem là đặc tính tiên hóa của *B. pseudomallei*. Nhiều vùng trên hai nhiễm sắc thể mang các đặc điểm của các đảo gen (genomic island-GI) nhận được qua quá trình truyền gen ngang, ví dụ như tỉ lệ GC bất thường hoặc các tín hiệu trình tự nucleotide lặp lại ở các vùng GI. Ngoài ra, các vùng này thường mang các CDS tương đồng với các gen liên quan đến các yếu tố di truyền vận động, như các trình tự xen (insert sequence-IS), thể thực khuẩn bacteriophage, và các plasmid (Holden et al., 2004).

Vi khuẩn *B. pseudomallei* có quan hệ họ hàng gần với hai loài *B. thailandensis* và *B. mallei* (Brett et al., 1998; Nierman et al., 2004). Về bộ gen, 2 loài *B. pseudomallei* và *B. thailandensis* tương tự nhau về cấu trúc 2 NST và thứ tự sắp xếp các gen trên 2 NST; các gen chức năng quy định các chức năng trao đổi chất và sinh trưởng của tế bào tương đồng nhau; nhưng các gen quy định độc lực vi khuẩn thì đã bị mất đi ở *B. thailandensis* hoặc sự tương đồng về trình tự gen không còn cao (Holden et al., 2006; Yu et al., 2006). Trong nuôi cấy, 2 loài vi khuẩn này có đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc giống nhau dẫn đến rất khó phân biệt (Ngamdee et al., 2015; Hantrakun et al., 2018), có lipopolysaccharide (LPS) tương tự nhau, có tính chất sinh vật hóa học tương tự nhau ngoại trừ *B. thailandensis* có khả năng đồng hóa đường arabinose và xylose (Wuthiekanun et al., 1996; Smith et al., 1997; Brett et al., 1997, 1998; Hantrakun et al., 2018). Trong khi đó, loài *B. mallei* kí sinh bắt buộc trên vật chủ và là tác nhân gây bệnh glander ở ngựa, la và khỉ, có khả năng lây truyền từ động vật sang động vật (Nierman et al., 2004). Các nghiên cứu cho thấy *B. mallei* tiến hóa từ một dòng tổ tiên của *B. pseudomallei*

thông qua sự tiêu biến các gen không cần thiết cho sự tồn tại ngoài môi trường tự nhiên và trở thành sinh vật ký sinh vật chủ hoàn toàn. Các nghiên cứu cho thấy bộ gen của *B. mallei* nhỏ hơn khoảng 1,5 Mb so với *B. pseudomallei* (Godoy et al., 2003; Nierman et al., 2004; Losada et al., 2010).

Các nhà khoa học đã chứng minh cụm gen thuộc hệ thống tiết nhóm III (type III secretion system-TTSS1) mã hóa cho yếu tố quyết định độc lực của *B. pseudomallei*, chỉ có mặt ở *B. pseudomallei* mà không có ở hai loài *B. thailandensis* và *B. mallei* (Smith-Vaughan et al., 2003; Kaestli, 2007). Đây là gen đích mà nhiều nghiên cứu đã khai thác phát triển kỹ thuật sinh học phân tử nhằm phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* trong lâm sàng cũng như ngoài môi trường (Gal et al., 2005; Novak et al., 2006; Kaestli 2007; Trung et al., 2011; Meumann et al., 2006).

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng phát hiện một số gen tham gia vào sự di động của *B. pseudomallei*. Trong số gen này có *fliC*, mã hóa cho flagellin. Các kháng thể kháng flagellin *B. pseudomallei* làm giảm đáng kể sự di động của vi khuẩn và hỗ trợ cho việc bảo vệ tế bào chống lại sự xâm nhập của *B. pseudomallei* ở động vật mô hình (Chua et al., 2003). Sprague và cs (2002) đã giải trình tự gen *fliC* của hai chủng *B. mallei* ATCC 15310 và *B. pseudomallei* ATCC 15682 và nhận thấy trình tự *fliC* ở hai loài vi khuẩn này chỉ khác nhau duy nhất một nucleotit vị trí 798 trên trình tự mã hóa. Tuy nhiên, trình tự acid amin dự đoán thì hoàn toàn giống nhau. Và khi so sánh trình tự tương ứng ở vi khuẩn *B. thailandensis* thì thấy sự khác biệt rõ rệt. Do vậy, trình tự *fliC* không thể phân biệt hai loài *B. mallei* và *B. pseudomallei* mà chỉ được dùng để phân biệt hai loài này với các loài *Burkholderia* còn lại (Sprague et al., 2002; Tomaso et al., 2005).

DeShazer và cs (1997) đã tìm thấy gen *rpsU* nằm ở vị trí ngược chiều với gen *fliC* ở chủng *B. pseudomallei* 1016b. Gene *rpsU* mã hóa cho protein tham gia vào tổng hợp các đại phân tử, có vai trò trong khởi đầu tổng hợp protein, DNA và RNA (DeShazer et al., 1997). Hagen và cs (2002) đã chứng minh sự sai khác của gen *rpsU* ở *B. mallei* và *B. pseudomallei* so với *B. thailandensis* và các loài *Burkholderia* khác. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng gen này có tính bảo thủ cao ở loài

*B. pseudomallei* và PCR gen *rpsU* đã xác định được DNA của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong mẫu bệnh phẩm chuột nhiễm bệnh (Hagen et al., 2002).

### **1.1.3. Bệnh nhiễm trùng melioidosis**

#### *1.1.3.1. Đặc điểm gây bệnh của vi khuẩn B. pseudomallei*

Từ những năm 1990, các nhà khoa học đã phát hiện một đặc tính quan trọng trong cơ chế gây bệnh của *B. pseudomallei* là khả năng sống ký sinh nội bào ở cả tế bào thực bào và các dòng tế bào khác (Allwood et al., 2011). Khả năng tồn tại nội bào là đặc điểm đặc biệt giúp vi khuẩn lẩn trốn khỏi hệ thống miễn dịch của vật chủ khi truyền bệnh. *B. pseudomallei* sử dụng hàng loạt các cơ chế giúp duy trì lợi thế sống sót trong vật chủ như cơ chế trốn thoát khỏi endosome, di động nhờ sợi actin, hình thành các tế bào khổng lồ đa nhân (multi-nucleated giant cells-MNGC), và trốn thoát tự thực bào của tế bào chủ (Adler et al., 2011; Wiersinga et al., 2018). Ngoài ra, nhờ có hệ gen lớn, *B. pseudomallei* có khả năng thích nghi cao và gây ra nhiều biểu hiện lâm sàng khác nhau tùy thuộc vào mô lây nhiễm. Hơn nữa, loài vi khuẩn này còn có khả năng kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh như penicillin, rifamycin, aminoglycoside, nhóm quinolon, macrolid và cephalosporin thế hệ 2, 3 (Simpson et al., 1999; Schweizer et al., 2012; Khosravi et al., 2014; Wiersinga et al., 2018). Thực tế, khả năng tồn tại nội bào và các đặc điểm thích nghi của *B. pseudomallei* đã giải thích cho hàng loạt các biểu hiện lâm sàng của melioidosis cũng như đặc tính tiềm ẩn bệnh, tái phát và khó điều trị. Giai đoạn tiềm ẩn bệnh trên 60 năm đã được y văn thế giới ghi nhận (Ngaury et al., 2005). Sự kích hoạt trạng thái nhiễm bệnh tiềm ẩn thường do suy giảm hệ thống miễn dịch của vật chủ và có thể dẫn tới nhiễm trùng cấp tính, tái cấp tính và tử vong. Hiện tượng tái phát bệnh sau điều trị là tương đối phổ biến ở bệnh nhân melioidosis (Maharjan et al., 2005).

#### *1.1.3.2. Đặc điểm lâm sàng melioidosis*

*B. pseudomallei* là căn nguyên nhiễm trùng melioidosis - bệnh gặp cả trên người và nhiều loài động vật. Melioidosis được ghi nhận lần đầu tiên ở Rangoon, Myanmar năm 1912 bởi A. Whitmore và C. S. Krishnaswami (Whitmore and

Krishnaswami, 1912). Bệnh được Thomas Stanton và William Fletcher đặt tên là melioidosis vào năm 1921. Melioidosis có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp có nghĩa là “giống bệnh glander” - glander là bệnh truyền nhiễm ở ngựa do vi khuẩn *B. mallei* gây ra (Stanton and Fletcher, 1921). Các con đường lây truyền chính của melioidosis là (i) qua tiếp xúc trực tiếp vết trầy xước da với đất hoặc nước nhiễm khuẩn; (ii) qua hít phải các hạt bụi hoặc hạt khí dung có chứa vi khuẩn; (iii) qua đường tiêu hóa khi ăn uống phải thực phẩm/nước nhiễm khuẩn. Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây tử vong cao và nhanh (trong vòng 48 giờ nhập viện) nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời đúng kháng sinh (Wiersinga et al., 2012).

Biểu hiện lâm sàng của melioidosis vô cùng đa dạng, từ nhiễm trùng huyết cấp tính đến bệnh lý mạn tính, nhiễm trùng tiềm ẩn có thể khởi phát sau nhiều thập kỷ phơi nhiễm (Maharjan et al., 2005). Do vậy, melioidosis cũng được gọi với thuật ngữ “the great mimicker” nhằm ám chỉ một bệnh có triệu chứng lâm sàng không điển hình và thường bị nhầm lẫn với các bệnh truyền nhiễm khác như lao phổi hoặc sốt thương hàn (Vidyalakshmi et al., 2008). Tỷ lệ tử vong do melioidosis dao động từ 30-70%, tùy thuộc vào điều kiện y tế ở từng quốc gia và bệnh nhân có bị nhiễm trùng huyết hay không (Vidyalakshmi et al., 2008; Puthuchearry et al., 2009).

Vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể tấn công nhiều cơ quan và gây các triệu chứng viêm phổi, áp-xe gan, áp-xe lách, viêm tim, viêm tuyến tiền liệt, viêm màng não v.v... Trong đó, phổi là cơ quan bị ảnh hưởng phổ biến nhất, các biểu hiện như ho và sốt do áp-xe phổi, hoặc viêm phổi lan truyền thứ phát đến nhiễm trùng huyết (Puthuchearry et al., 2009). Theo báo cáo của Cheng và cs (2005), trong số các ca nhiễm melioidosis, hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện nhiễm trùng huyết và viêm phổi (Cheng et al., 2005). Ngoài ra, một số triệu chứng lâm sàng có thể khác nhau giữa các khu vực, như viêm tuyến nước bọt mang tai thường chiếm khoảng 40% trong số bệnh nhân tại Thái Lan nhưng rất hiếm gặp tại Úc; viêm đường tiết niệu thường gặp ở các bệnh nhân nam tại Úc (19%); hay một số ca tại Úc có biểu hiện viêm màng não (4%). Tỷ lệ bệnh nhân melioidosis bị áp-xe gan và áp-xe lách ở



Thái Lan cao hơn ở Úc. Một số bệnh nhân có các biểu hiện khác như viêm khớp, viêm tủy xương, viêm tim, viêm phúc mạc cũng đã được ghi nhận (Malczewski et al., 2005; Vidyalakshmi et al., 2008). Bên cạnh đó, mung mủ vết thương ngoài da cũng thường gặp trên những bệnh nhân melioidosis (Achappa et al., 2016).

Yếu tố nguy cơ phổ biến nhất của melioidosis là bệnh tiểu đường, khoảng 23-60% bệnh nhân melioidosis trên toàn thế giới mắc tiểu đường (Limmathurotsakul et al., 2010; Currie et al., 2015). Người mắc tiểu đường có nguy cơ nhiễm melioidosis cao hơn 12 lần các yếu tố nguy cơ khác khi so sánh tương đồng theo tuổi và giới tính (Limmathurotsakul et al., 2010). Các yếu tố nguy cơ khác bao gồm tiếp xúc với đất hoặc nước (đặc biệt là trong mùa mưa), giới tính nam (có thể do nguy cơ tiếp xúc nhiều hơn với môi trường), trên 45 tuổi, nghiện rượu, mắc bệnh gan, bệnh phổi mạn tính, bệnh thận mạn tính và thalassemia (Cheng et al., 2005; Fong et al., 2015). Sử dụng steroid kéo dài và thuốc ức chế miễn dịch cũng là yếu tố nguy cơ của nhiễm trùng melioidosis. Tuy nhiên, trên 80% bệnh nhi và gần 20% bệnh nhân trưởng thành nhiễm melioidosis mà không có yếu tố nguy cơ nào được ghi nhận (McLeod et al., 2015; Currie et al., 2004). Melioidosis ở người lớn không có yếu tố nguy cơ thường xảy ra ở những người đã phơi nhiễm với lượng vi khuẩn cao, như khi hít phải nước bề mặt chứa vi khuẩn (Lim et al., 1997). Các hiện tượng thời tiết bất thường như mưa bão và sóng thần cũng là các yếu tố nguy cơ dẫn đến nhiễm trùng melioidosis (Currie et al., 2003; Peacock et al., 2006). Sự lây truyền melioidosis từ động vật sang người do tiếp xúc với gia súc nhiễm bệnh là rất hiếm. Chỉ có 3 trường hợp nghi ngờ lây nhiễm theo con đường này được báo cáo ở Úc (Cheng et al., 2005).

#### *1.1.3.3. Đáp ứng miễn dịch với nhiễm trùng melioidosis*

Thời gian qua, melioidosis và *B. pseudomallei* đã thu hút sự chú ý ngày càng lớn của các nhà khoa học trên toàn thế giới và các nghiên cứu liên quan cũng tăng lên đáng kể (Yi et al., 2019). Tuy nhiên, những hiểu biết về cơ chế sinh bệnh cũng như đáp ứng miễn dịch của vật chủ vẫn còn nhiều hạn chế (Currie et al., 2015). Yi và cs (2019) đã thực hiện mô hình gây nhiễm melioidosis trên động vật (trên dê)

qua con đường hô hấp dẫn đến nhiễm trùng toàn thân nhằm nghiên cứu phản ứng miễn dịch dịch thể của vật chủ. Lý do được chọn để làm mô hình miễn dịch do nó đặc điểm nhiễm trùng giống người và loài này thường gặp ở các vùng lưu hành bệnh (Yi et al., 2019).

Trong suốt quá trình lây nhiễm, kết quả xét nghiệm cho thấy đáp ứng miễn dịch của kháng thể IgG lớn hơn nhiều so với IgM và lượng IgG gia tăng rõ rệt khi bệnh tiến triển. Kháng thể IgG tăng từ nồng độ trung bình 11.348  $\mu\text{g/ml}$  vào ngày thứ 7 đến 26.666  $\mu\text{g/ml}$  vào ngày 14 và đạt tối đa 35.088  $\mu\text{g/ml}$  vào ngày 21. Trong khi đó, lượng kháng thể IgM chỉ bằng 1/4 đến 1/2 so với kháng thể IgG vào cả ba thời điểm ngày lây nhiễm thứ 7, 14 và 21. Đặc biệt, lượng IgM hầu như không đổi ở mọi thời điểm lây nhiễm. Tác giả đánh giá việc phơi nhiễm với *B. pseudomallei* bằng khí dung đã tạo ra kháng thể đa dạng và phản ứng tiến triển theo thời gian gây nhiễm (Yi et al., 2019).

Phản ứng miễn dịch với các protein chaperone (GroEL, EF-Tu và DnaK) được ghi nhận ở nhiễm trùng giai đoạn đầu (ngày thứ 7), 3 loại protein này được phát hiện trong tất cả các mẫu huyết thanh sau khi nhiễm trùng, đặc biệt là GroEL. Bảy kháng nguyên gây phản ứng miễn dịch thường gặp (PDHD, TPX, AhpC2, Eno, GroEL, CPS và OPS A) đã được chọn để phân tích sâu hơn bằng ELISA nhằm đánh giá lượng kháng thể tạo ra ở từng giai đoạn nhiễm trùng. Kết quả cho thấy hàm lượng IgG kháng lại 4 loại kháng nguyên (PDHD, AhpC2, Eno và CPS) được phát hiện vào ngày thứ 14 dao động từ 110-133  $\mu\text{g/ml}$ , trong khi TPX và OPS A là 48,9  $\mu\text{g/ml}$ . Riêng IgG kháng GroEL đạt hàm lượng 330  $\mu\text{g/ml}$  vào ngày thứ 7 và 5.579  $\mu\text{g/ml}$  vào ngày thứ 21. Trong khi đó, IgM tăng chủ yếu từ ngày 14 với CPS là 28  $\mu\text{g/ml}$ , với GroEL là 65  $\mu\text{g/ml}$ . Ba kháng nguyên có mức độ đặc hiệu kháng nguyên cao với kháng thể IgG so với IgM ở ngày 21 là AhpC2, Eno và GroEL. Ngược lại, các kháng nguyên PDHD, TPX, CPS và OPS A vào ngày 21 đã tạo ra nồng độ IgM đặc hiệu khá cao so với kháng thể IgG.

Do GroEL có phản ứng miễn dịch cao nhất với cả IgM và IgG nên nghiên cứu đã so sánh từng kháng nguyên với GroEL và kết quả cho thấy kháng nguyên

GroEL sốc nhiệt tạo ra phản ứng miễn dịch mạnh nhất so với 6 loại kháng nguyên còn lại, đặc biệt với IgG. Hiện tượng này có thể do trước đó dê đã tiếp xúc với protein GroEL ở trong các vi khuẩn gram âm khác có trình tự acid amin bảo thủ tương tự GroEL của *B. pseudomallei*. Đối với đáp ứng miễn dịch kháng thể IgM của dê, ba loại kháng nguyên CPS, GroEL và OPS A cho phản ứng mạnh nhất vào ngày thứ 7, các kháng nguyên còn lại có mức độ phản ứng tương tự nhau. Tuy nhiên, vào ngày 14, mức độ đáp ứng miễn dịch kháng nguyên IgM của cả 7 kháng nguyên là tương đối giống nhau. Nhưng đến ngày thứ 21, CPS cho phản ứng kháng thể IgM của dê cao nhất so với các kháng nguyên khác (Yi et al., 2019).

Trên người, Pumpuang và cs (2017) đã đưa ra những bằng chứng về sự đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên Hcp1 ở các bệnh nhân melioidosis trong giai đoạn sớm của quá trình nhiễm trùng (Pumpuang et al., 2017). Phần lớn bệnh nhân melioidosis ngay sau khi nhập viện đã sản sinh một lượng đáng kể kháng thể kháng lại Hcp1. Các bệnh nhân melioidosis phục hồi tiếp tục được theo dõi. Sau khoảng 12-52 tuần kể từ ngày nhập viện, lượng kháng thể đặc hiệu với Hcp1 trong huyết thanh những bệnh nhân melioidosis này vẫn ở mức cao hơn đáng kể so với người không nhiễm melioidosis, mặc dù nó có xu hướng giảm dần theo thời gian. Trong khoảng 12 tuần đầu kể từ lúc nhập viện, 50,5% bệnh nhân melioidosis có lượng kháng thể đặc hiệu với Hcp1 không thay đổi và khoảng 19,4% bệnh nhân có lượng kháng thể kháng lại Hcp1 tăng hơn so với tại thời điểm mới nhập viện. Đáng chú ý là những bệnh nhân melioidosis bị tiểu đường có lượng kháng thể đặc hiệu với Hcp1 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với bệnh nhân melioidosis không bị tiểu đường. Vì vậy, nghiên cứu đã đánh giá xét nghiệm huyết thanh sử dụng với kháng nguyên Hcp1 là xét nghiệm có độ chính xác cao (Pumpuang et al., 2017).

Tuy nhiên, theo Phokrai và cs (2018) độ chính xác của xét nghiệm miễn dịch sử dụng kháng nguyên Hcp1 trong xét nghiệm melioidosis thống kê khoảng 10% bệnh nhân dương tính với melioidosis (đã được khẳng định bằng nuôi cấy) nhưng không tạo kháng thể kháng đặc hiệu với Hcp1 (Phokrai et al., 2018). Các giả thuyết được đưa ra để giải thích cho hiện tượng này là (1) do tình trạng suy giảm miễn dịch

ở một số bệnh nhân, hoặc (2) thời gian lấy mẫu xét nghiệm huyết thanh kể từ khi khởi phát bệnh là quá ngắn nên kháng thể IgG đặc hiệu Hcp1 chưa tạo thành (Pumpuang et al., 2019). Do vậy, việc lặp lại xét nghiệm ELISA ở các thời điểm khác nhau, kết hợp với đánh giá tiền sử và tiến triển của bệnh nhân, đồng thời sử dụng thêm các chẩn đoán khác cần được cân nhắc thực hiện.

#### **1.1.4. Phân bố vi khuẩn *B. pseudomallei* và ca nhiễm melioidosis**

##### *1.1.4.1. Phân bố vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường*

Loài vi khuẩn *B. pseudomallei* sống hoại sinh trong môi trường đất và nước ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Đông Nam và Nam Á, Bắc Úc, phía tây tiểu vùng Sahara châu Phi và Nam Mỹ (Limmathurotsakul et al., 2016). Bằng chứng thực nghiệm đầu tiên về bản chất hoại sinh của *B. pseudomallei* và môi trường sống của nó đã được Vaucel chứng minh tại Việt Nam vào năm 1937 (Vaucel, 1937). Ông quan sát thấy những người bị nhiễm trùng melioidosis sau tai nạn giao thông hoặc ngâm mình lâu trong nước ao hồ hoặc có vết thương bị nhiễm bùn. Để kiểm tra giả thuyết *B. pseudomallei* tồn tại trong môi trường, Vaucel nhấn chìm phần bụng bị trầy xước của chuột lang vào nước ao lấy tại Hải Dương. Năm ngày sau, con chuột nhiễm bệnh và *B. pseudomallei* đã được phân lập từ mù gan, lá lách và các vị trí khác bằng môi trường thạch ở điều kiện nuôi cấy vô trùng (Vaucel, 1937; Trung et al., 2018).

Vi khuẩn *B. pseudomallei* có đặc tính thích nghi cao với các điều kiện bất lợi. Nó có khả năng tồn tại tới 17 năm trong nước cất hoặc 2 năm trong đất có độ ẩm trên 40% (Thomas and Forbes-Faulkner, 1981; Tong et al., 1996). Sự tồn tại của vi khuẩn ngoài môi trường tự nhiên phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó, độ ẩm, pH, thành phần dinh dưỡng của đất, loại đất và đặc điểm canh tác là các yếu tố thường được quan tâm nghiên cứu (Chen et al., 2003; Kaestli et al., 2009; Suebrasri et al., 2013; Baker et al., 2015; Hantrakun et al., 2016).

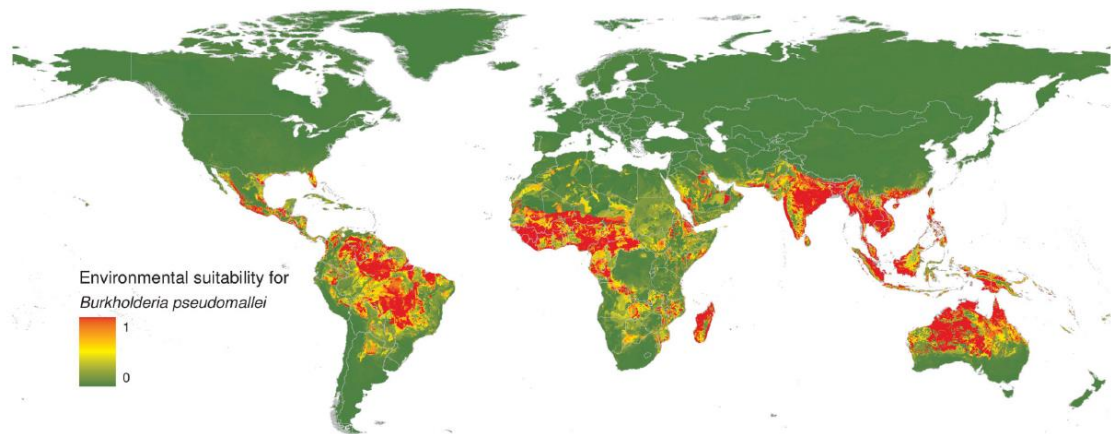
Trong đất, vi khuẩn thường phân bố ở độ sâu 30 cm, pH hơi acid, độ ẩm trên 10%, chỉ số COD và hàm lượng chất hữu cơ cao (Palasatien et al., 2008). Tuy nhiên, một nghiên cứu khác cho thấy vi khuẩn *B. pseudomallei* được bắt gặp nhiều

hơn ở độ sâu 60 và 90 cm so với 5 và 30 cm, và việc thu thập mẫu ở độ sâu 60 cm đã làm tăng xác suất các điểm lấy mẫu dương tính với *B. pseudomallei* từ khoảng 30% lên hơn 40% (Manivanh et al., 2017). Điều này chứng minh vi khuẩn có thể tồn tại trong lớp đất sâu hơn vào mùa khô và di chuyển lên bề mặt vào mùa mưa (Thomas et al., 1979; Wuthiekanun et al., 1995). Wuthiekanun và cs (1995) cũng đã công bố tỷ lệ phân lập được vi khuẩn cao nhất ở các tầng đất sâu nhất được lấy mẫu, 60 cm vào mùa mưa và 90 cm vào mùa khô (Wuthiekanun et al., 1995). Các nghiên cứu khác cũng cho thấy tần suất bắt gặp *B. pseudomallei* ở lớp đất gần bề mặt là thấp hơn ở tầng đất sâu (Thomas et al., 1979; Wuthiekanun et al., 1995; Kao et al., 2003; Kaestli et al., 2007). Việc tiêu chuẩn hóa độ sâu lấy mẫu là 30 cm dựa trên các nghiên cứu được thực hiện tại Thái Lan (Limmathurotsakul et al., 2013.) có thể dẫn đến việc đưa ra kết quả âm tính giả với các khu vực có mức độ ô nhiễm *B. pseudomallei* thấp (Manivanh et al., 2017). Một nghiên cứu về sự đa dạng của vi sinh vật trong môi trường đất ở độ sâu 188 m cho thấy *Burkholderia* spp. là một trong những nhóm vi sinh vật được bắt gặp thường xuyên nhất (Chandler et al., 1998). Thêm vào đó, sự hiện diện của *B. pseudomallei* trong 33% giếng khoan ở Bắc Úc cũng góp phần chứng minh khả năng vi khuẩn tồn tại ở độ sâu lớn (Mayo et al., 2011).

Ở vùng lưu hành bệnh dịch melioidosis, sự hiện diện của *B. pseudomallei* thường được điều tra trong đất trồng lúa (Vuddhakul., 1999; Wuthiekanun et al., 2005). Tuy nhiên, đợt bùng phát bệnh dịch melioidosis sau thảm họa sóng thần vào năm 2004 tại Thái Lan đã dẫn đến giả thuyết rằng *B. pseudomallei* có thể tồn tại trong nước biển hoặc trong đất/cát vùng ven biển (Inglis and Sagripanti, 2006). Theo nghiên cứu của Baker và cs (2011), tỷ lệ nhiễm melioidosis liên quan mật thiết đến lượng mưa và các hiện tượng thời tiết khắc nghiệt. Chùm ca bệnh được phát hiện ở vùng Townsville (Úc) có liên quan đến tần suất và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước bề mặt. Sau các cơn mưa, vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất sẽ bị cuốn theo các mạch nước rỉ ra từ vùng đồi Castle làm cho tần suất bắt gặp và mật độ tế bào vi khuẩn tăng lên đáng kể với 65% mẫu đất và 92% mẫu nước

dương tính với *B. pseudomallei*, mật độ vi khuẩn trong nước lên tới 113 CFU/mL (Baker et al., 2011). Ngoài ra, nhiều nhà khoa học đã công bố có ít nhất 4 đợt bùng phát dịch melioidosis ở Úc liên quan đến việc nguồn nước sinh hoạt bị nhiễm *B. pseudomallei* do không được xử lý chlorine hoặc do hệ thống khử trùng nước bị hỏng (Currie et al., 2001; Inglis et al., 2011; Mayo et al., 2011; McRobb et al., 2013; McRobb et al., 2015). *B. pseudomallei* có mặt trong nguồn nước sinh hoạt là thông tin giúp tư vấn cho việc xây dựng tiêu chuẩn cho hệ thống cấp nước và hướng dẫn thực hiện các biện pháp y tế phòng chống nhằm giảm tỷ lệ nhiễm melioidosis ở các vùng dịch bệnh.

Năm 2016, Limmathurotsakul và cs đã công bố bản đồ dự đoán sự hiện diện của *B. pseudomallei* ngoài môi trường và ước tính hàng năm có khoảng 165.000 ca nhiễm và 89.000 ca tử vong do melioidosis trên toàn thế giới. Cơ sở dữ liệu toàn cầu đã được thu thập, bao gồm 22.338 hồ sơ định vị địa lý về các ca nhiễm melioidosis ở người và động vật, cũng như sự hiện diện của *B. pseudomallei* ngoài môi trường trong các báo cáo được công bố từ năm 1910-2014. Nghiên cứu đã dự đoán *B. pseudomallei* có mặt ở khắp các vùng nhiệt đới (Hình 1.4). Các vùng có nguy cơ cao nhất là Đông Nam và Nam Á, nhiệt đới Úc, Tây cận Sahara, châu Phi và Nam Mỹ. Các vùng nguy cơ có quy mô khác nhau cũng được báo cáo ở Trung Mỹ, Nam Phi và Trung Đông. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng lượng mưa và nhiệt độ cao, các loại đất anthrosol (đất nhân tác) và acrisol (đất đỏ vàng) có liên quan chặt chẽ đến sự hiện diện của *B. pseudomallei*. Anthrosol là một loại đất đã bị biến đổi sâu sắc bởi các hoạt động của con người, đặc biệt là bởi nông nghiệp được tưới tiêu, và acrisol là loại đất giàu đất sét ở vùng khí hậu nhiệt đới. Limmathurotsakul và cs cũng nhận thấy lượng muối và tỷ lệ cát/sỏi cao có liên quan đến sự hiện diện của *B. pseudomallei* (Limmathurotsakul et al., 2016).



**Hình 1.4.** Dự đoán về tính phù hợp môi trường đối với sự tồn tại của *B. pseudomallei*. Các khu vực phù hợp cao được thể hiện bằng màu đỏ và các khu vực phù hợp thấp có màu xanh lục (Limmathurotsakul et al., 2016)

#### 1.1.4.2. Phân bố ca nhiễm melioidosis

Vi khuẩn *B. pseudomallei* chủ yếu tồn tại ở vị trí địa lý giữa 20 vĩ độ Bắc và 20 vĩ độ Nam (Currie et al., 2008). Ngoài Đông Nam Á và Bắc Úc được công nhận là các vùng lưu hành melioidosis cao, thì nhiều khu vực khác cũng đã được chứng minh là vùng lưu hành của bệnh (Limmathurotsakul et al., 2016). Các khu vực này bao gồm phần lớn tiểu lục địa Ấn Độ, miền nam Trung Quốc, Hồng Kông, Đài Loan (Currie et al., 2008), châu Phi, một số quốc gia Trung Đông (Steinmetz et al., 2018), Trung và Nam Mỹ (Rolim et al., 2018).

Melioidosis được mô tả lần đầu tiên vào năm 1912 tại Myanmar, sau đó bệnh lần lượt được phát hiện tại các quốc gia khác như Malaysia (năm 1913), Singapore (năm 1920), Việt Nam (năm 1925) và Indonesia (năm 1929). Tuy nhiên, đến năm 1949 melioidosis mới được phát hiện tại Úc, và năm 1955 ở Thái Lan, mặc dù đây là hai quốc gia lưu hành bệnh với tỷ lệ nhiễm cao nhất thế giới. Cho đến nay, Thái Lan là quốc gia có số ca nhiễm melioidosis lớn nhất với ước tính khoảng 2.000 đến 3.000 ca melioidosis mỗi năm, và hầu hết được ghi nhận từ các tỉnh Đông Bắc (Currie et al., 2015). Ngoài ra, melioidosis còn được phát hiện tại Brunei (năm 1999), Lào (năm 2001) và Campuchia (năm 2008) (Currie et al., 2015). Vào những năm 1970, Trung Quốc đã phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất, nước và các ca nhiễm melioidosis trên người và vật nuôi ở đảo Hải Nam và Quảng Đông.

Đài Loan và Hồng Kông cũng ghi nhận nhiều ca nhiễm melioidosis, đặc biệt sau các trận bão (Ko et al., 2007; Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2020). Trường hợp đầu tiên nhiễm melioidosis đã được báo cáo từ Hàn Quốc là trên một bệnh nhân có thể đã từng tiếp xúc với vi khuẩn khi làm việc tại Indonesia (Lee et al., 2005). Trong khi đó chưa có ca nhiễm melioidosis nào được công bố ở Triều Tiên.

Trong số các quốc gia Nam Á, Bangladesh và Sri Lanka được coi là vùng dịch tễ của melioidosis (Mohapatra and Mishra, 2022). Ca nhiễm melioidosis đầu tiên được phát hiện ở Sri Lanka vào năm 1927 (Mukhopadhyay et al., 2018). Bên cạnh đó, một số ca bệnh đã được ghi nhận từ Nepal, và một số trường hợp nhiễm melioidosis sau khi trở về từ Pakistan (Mohapatra and Mishra, 2022). Năm 1953, Ấn Độ công bố ca melioidosis đầu tiên là một công nhân người Scotland, nhưng phải đến năm 1991 quốc gia này mới ghi nhận ca nhiễm melioidosis trên người Ấn bản địa. Trong khi đó, Bhutan và Afghanistan chưa xác định được ca nhiễm melioidosis nào mặc dù nghiên cứu điều tra đã dự đoán bệnh có khả năng lưu hành ở các quốc gia này (Limmathurotsakul et al., 2016). Việc không phát hiện được ca bệnh có thể do sự hạn chế trong xét nghiệm chẩn đoán vi sinh tại đây (Mukhopadhyay et al., 2018).

Năm 1950, tại Bắc Mỹ, ca nhiễm melioidosis đầu tiên được ghi nhận trên một binh sĩ Hoa Kỳ. Người này không có lịch sử di chuyển đến vùng dịch hoặc ngoài lãnh thổ Hoa Kỳ. Đến năm 1970, ca nhiễm melioidosis thứ hai tại Hoa Kỳ là một trẻ sơ sinh có cha từng tham chiến tại Việt Nam, nhưng chưa từng tiếp xúc với trẻ. Kể từ đó, có thêm 3 trường hợp người Mỹ bản địa nhiễm melioidosis được ghi nhận từ năm 2010-2013 tại California, Arizona và Ohio. Tất cả các bệnh nhân kể trên đều không có lịch sử di chuyển tới vùng dịch và không phát hiện được nguồn lây. Vì vậy, một số chuyên gia đã đưa ra nhận định về khả năng melioidosis có thể là bệnh truyền nhiễm mới nổi ở quốc gia này (Stewart et al., 2011; Doker et al., 2014). Trong khi đó, tại Trung Mỹ, melioidosis đã được ghi nhận ở nhiều quốc gia và đảo gồm Panama (1945), Mexico (1958), El Salvador (1981), Costa Rica (1998), Honduras (2005), Guatemala (2012) và các đảo thuộc vùng Caribe như Puerto Rico



(1982) hoặc Dominica (Sanchez-Villamil and Torres, 2018). Tương tự, tại Nam Mỹ, trường hợp nhiễm melioidosis đầu tiên được báo cáo năm 1964 ở Ecuador (Biegeleisen et al., 1964). Hơn 15 năm sau, một số nghiên cứu công bố *B. pseudomallei* được phân lập từ đất tại Brazil và Peru (Galimand and Dodin, 1982; Dance, 1991). Kể từ những ca melioidosis đầu tiên được ghi nhận, từ năm 1990, các quốc gia gồm Venezuela, Colombia, Brazil và Peru lần lượt công bố ca nhiễm melioidosis (Rolim et al., 2018). Dựa trên phân tích di truyền của các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ Ecuador, Venezuela và Brazil, các nhà khoa học cho rằng các chủng *B. pseudomallei* ở Trung và Nam Mỹ có thể có nguồn gốc từ châu Phi và được du nhập thông qua thuộc địa hóa và buôn bán nô lệ vào những năm 1650-1850 (Chewapreecha et al., 2017).

Tại châu Phi, dịch tễ học của melioidosis vẫn chưa được biết chính xác mặc dù trước đây căn bệnh này đã được báo cáo ở một số quốc gia. Nguyên nhân do sự thiếu thốn về trang thiết bị tại các phòng xét nghiệm chẩn đoán vi sinh ở các quốc gia này. Thực tế, điều kiện tự nhiên ở châu Phi thích hợp cho sự tồn tại của *B. pseudomallei* (Limmathurotsakul et al., 2016). Có 24 quốc gia châu Phi và 3 quốc gia ở Trung Đông đã được dự đoán là nơi lưu hành bệnh, nhưng chưa có ca nhiễm melioidosis nào được báo cáo (Steinmetz et al., 2018).

Melioidosis đã được ghi nhận tại châu Âu trên những bệnh nhân từng đi qua vùng dịch ở các nước châu Á (66 ca), châu Phi (7 ca), châu Mỹ (4 ca) và châu Úc (2 ca). Tất cả bệnh nhân đều có lịch sử du lịch và lưu trú tại vùng dịch trong khoảng một tháng và phát bệnh sau khi trở về châu Âu một tháng. Trong số các ca bệnh được phát hiện, có 41 ca đã từng đi du lịch đến Thái Lan, chỉ có 7 ca đến Việt Nam và Campuchia. Mặc dù chưa ghi nhận được ca nhiễm melioidosis có nguồn lây tại châu Âu nhưng nghiên cứu cho rằng melioidosis có thể trở thành vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng và cần được xem xét về các khía cạnh như tỷ lệ nhiễm gia tăng, năng lực chẩn đoán hạn chế, khó khăn trong điều trị, tỷ lệ tử vong cao và các nguy cơ sinh học khác (Le Tohic et al., 2019).

#### 1.1.4.3. Mối tương quan giữa các biến chủng *B. pseudomallei* và biểu hiện lâm sàng melioidosis

Melioidosis có biểu hiện lâm sàng rất đa dạng và không điển hình, trong đó viêm phổi và nhiễm trùng huyết nặng là biểu hiện nghiêm trọng nhất được ghi nhận (Cheng et al., 2004). Nhiều nghiên cứu đã công bố biểu hiện lâm sàng bệnh có liên quan đến khu vực lưu hành bệnh. Cụ thể, nhiễm trùng melioidosis với các biểu hiện viêm đường sinh dục tiết niệu, đặc biệt là viêm tiền liệt tuyến, và viêm não tủy thường gặp ở các bệnh nhân ở Bắc Úc; trong khi đó áp-xe tuyến mang tai và viêm gan, lách thường được mô tả ở các bệnh nhân Thái Lan (Currie et al., 2000; White et al., 1994; Dance, 2004). Sarovich và cs (2014) đã chứng minh sự khác nhau trong biểu hiện lâm sàng bệnh có liên quan đến sự hoạt động các gen nhất định của vi khuẩn *B. pseudomallei*, đặc biệt phải kể đến gen *bimABm* liên quan đến melioidosis trên hệ thần kinh (Sarovich et al., 2014). Tuy nhiên, cho đến nay các minh chứng về sự đa dạng các biểu hiện lâm sàng cũng như kết quả điều trị của bệnh nhân melioidosis vẫn chưa được biết rõ, nhiều giả thuyết cho rằng đặc điểm vật chủ, biến chủng vi khuẩn và môi trường là các yếu tố quyết định (Cheng et al., 2004).

Thông qua các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử, sự đa dạng các biến chủng và sự phân bố của vi khuẩn *B. pseudomallei* được làm rõ (Currie et al., 2008). Trong nghiên cứu về dịch tễ học phân tử, các kỹ thuật thường được sử dụng gồm điện di xung trường (pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) (Azura et al., 2011), khuếch đại đa hình ngẫu nhiên (random amplification of polymorphic RAPD) (Norton et al., 1998), ribotyping (Pitt et al., 2000) và giải trình tự toàn hệ gen (Price et al., 2015). Trong đó, kỹ thuật phân tích đa hình trình tự các kiểu gen (Multi-locus sequence typing - MLST) là một cách tiếp cận phân tử khác giúp đơn giản hóa việc trao đổi kết quả phân tích đa dạng di truyền giữa các lần thí nghiệm trong cùng một phòng thí nghiệm và giữa các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới (Maiden et al., 1998). MLST có khả năng phân tách các biến chủng *B. pseudomallei* với độ chính xác tương đương với kỹ thuật PFGE (Godoy et al., 2003; Cheng et al., 2004).

Cơ sở dữ liệu MLST *B. pseudomallei* là nguồn tài nguyên phong phú để đánh giá cấu trúc quần thể bộ gen dựa trên bảy house-keeping gene

(<https://pubmlst.org/bpseudomallei>) (Jolley et al., 2010). Kể từ khi dữ liệu MLST *B. pseudomallei* được xây dựng vào năm 2003 (Godoy et al., 2003), đã có 6.716 chủng được lưu trữ hồ sơ MLST trong cơ sở dữ liệu tính đến tháng 6/2023. Tổng số 2.026 kiểu trình tự (sequence type - ST) được xác định. Trong đó, 174 chủng phân lập từ Việt Nam được công bố, thuộc 79 ST, điều này cho thấy sự đa dạng về kiểu gen của quần thể *B. pseudomallei* ở nước ta. Có 31 ST được công bố xuất hiện duy nhất ở Việt Nam cho đến nay và hầu hết các ST còn lại cũng có mặt ở với các nước láng giềng như Thái Lan hoặc Campuchia. Theo phân tích của Phương và cộng sự (2008), dữ liệu MLST của *B. pseudomallei* hiện tại cho thấy các chủng Việt Nam chủ yếu có tính chất tạo cụm với các ST của các quốc gia châu Á chứ không phải các ST từ Úc (Phuong&Trung et al., 2008; Trung et al., 2018).

Việc phân biệt các biến chủng *B. pseudomallei* bằng hồ sơ MLST rất hữu ích trong việc phát hiện các ST trong các quần thể cụ thể (Zueter et al., 2015), dự đoán sự phân bố các ST của vi khuẩn trong một khu vực địa lý nhất định (Wuthiekanun et al., 2009), theo dõi nguồn phát sinh bệnh melioidosis trong các đợt bùng phát (Inglis et al., 2000), xác định nguyên nhân tái phát bệnh là do ST cũ hay nhiễm ST khác (Maharjan et al., 2005) và đánh giá mối liên quan giữa ST và tình trạng bệnh nhân, kết quả điều trị (Zueter et al., 2018; Cheng et al., 2004). Cho đến nay, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu về mối liên quan giữa ST với kết quả điều trị ca bệnh melioidosis, tuy nhiên tất cả các nghiên cứu đều đưa ra kết luận kết quả điều trị phụ thuộc vào đặc điểm thể trạng người bệnh và yếu tố môi trường chứ không do biến chủng quyết định (Cheng et al., 2004; Zueter et al., 2015; Kamthan et al., 2018).

## 1.2. NGHIÊN CỨU VỀ *B. pseudomallei* VÀ MELIOIDOSIS TẠI VIỆT NAM

### 1.2.1. Nghiên cứu về *B. pseudomallei*

Bằng chứng đầu tiên về khả năng sống hoại sinh ngoài môi trường tự nhiên của *B. pseudomallei* đã được Vaucel chứng minh tại Việt Nam vào năm 1937 (Vaucel, 1937). Khoảng 20 năm sau, vào năm 1955, Chambon đã phân lập trực tiếp 7 chủng *B. pseudomallei* từ 5 mẫu môi trường (bùn ao, nước ao và nước ruộng lúa) tại miền Nam Việt Nam (Chambon, 1955). Năm 1961, Luong và Kim cũng đưa

thêm bằng chứng về sự tồn tại của *B. pseudomallei* trong môi trường tự nhiên, với 2 chủng được phân lập từ nước ruộng rau muống (Luong and Kim, 1961).

Sau ngày giải phóng, một số nghiên cứu đã được thực hiện với mẫu đất ruộng lúa, *B. pseudomallei* được phân lập từ 4/240 mẫu đất, và 1/190 mẫu nước bề mặt thu thập trong ruộng lúa tại 4 xã ngoại thành Hà Nội (Van Phung et al., 1993). Tại miền Nam, một nghiên cứu khác cũng phân lập được vi khuẩn *B. pseudomallei* từ 9/137 mẫu đất ruộng lúa ở ngoại thành thành phố Hồ Chí Minh (Tp HCM) từ năm 1992-1998 (Parry et al., 1999). Tỷ lệ phát hiện *B. pseudomallei* thấp trong các nghiên cứu nói trên có thể do quy trình nuôi cấy *B. pseudomallei* từ mẫu môi trường tại thời điểm đó có độ nhạy thấp (Göhler et al., 2017).

Năm 2014-2017, đề tài khoa học “Thiết lập mạng lưới Quốc gia về nghiên cứu, chẩn đoán và điều trị bệnh melioidosis tại Việt Nam” (RENOMAB) do PGS. TS. Đoàn Mai Phương và TS. Trịnh Thành Trung cùng các cộng sự thực hiện. Song song với điều tra ca bệnh, nghiên cứu đã thu 4.030 mẫu đất tại 403 điểm tại đồng bằng Bắc Bộ, bắc Trung Bộ và đồng bằng Nam Bộ. Dựa trên 2 bước kỹ thuật (1) làm giàu bằng môi trường chọn lọc TBSS-C50 (Limmathurotsakul et al., 2013) và (2) real-time PCR TTSS1 (Novak et al., 2006; Trung et al., 2011), nghiên cứu đã xác định được các điểm dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei* và đã lập được bản đồ phân bố ở các khu vực lấy mẫu. Cụ thể, nghiên cứu đã phát hiện 567 (14,1%) mẫu ở 114 (28,3%) điểm dương tính với *B. pseudomallei*; trong đó tại đồng bằng Bắc Bộ phát hiện được 47 (4,7%) mẫu ở 12 (12%) điểm dương tính, tại bắc Trung Bộ phát hiện được 342 (18,6%) mẫu ở 63 (34,2%) điểm dương tính, tại đồng bằng Nam Bộ phát hiện được 178 (15%) mẫu ở 39 (32,8%) điểm dương tính.

Một nghiên cứu dự đoán về phân bố của *B. pseudomallei* trên toàn thế giới cho thấy tính chất tự nhiên của đất trên phần lớn lãnh thổ Việt Nam phù hợp cho loài vi khuẩn này (Limmathurotsakul et al., 2016), ngoại trừ một số khu vực ở vùng núi gần biên giới Lào và Trung Quốc, đặc biệt là vùng Tây Bắc, một số vùng ở Tây Nguyên và vùng hạ lưu duyên hải Nam Trung Bộ. Vai trò quan trọng của các nghiên cứu điều tra môi trường ở Việt Nam là vừa kiểm tra tính sát thực của những dự đoán này, vừa khảo sát các yếu tố môi trường thích hợp cho *B. pseudomallei*.

Việt Nam có sự đa dạng về điều kiện tự nhiên từ rừng mưa nhiệt đới đến rừng khô, đồng cỏ tự nhiên và đất nông nghiệp như cánh đồng lúa đến các sinh cảnh đất ngập nước bao gồm sông hồ và ven biển. Đến nay, ngoài một số ít các nghiên cứu điều tra vi khuẩn trong đất và nước ruộng lúa, chưa có nghiên cứu nào đánh giá tính phù hợp với môi trường tự nhiên cho sự sinh trưởng của *B. pseudomallei*. Về khí hậu, Việt Nam có sự mở rộng rất lớn theo hướng Bắc - Nam, bao gồm khí hậu cận nhiệt đới ẩm ở phía Bắc, khí hậu nhiệt đới gió mùa ở miền Trung và khí hậu nhiệt đới khô và ẩm ở phía Nam, có thể là yếu tố ảnh hưởng không nhỏ tới sự hiện diện của *B. pseudomallei* trong môi trường. Việc xác định chính xác các khu vực có nguy cơ lây nhiễm và ảnh hưởng của môi trường đất/nước và các yếu tố khí hậu đến sự hiện diện của *B. pseudomallei* là hết sức cần thiết (Trung et al., 2018).

### **1.2.2. Nghiên cứu điều tra ca nhiễm melioidosis**

Ca nhiễm melioidosis đầu tiên ở người tại Việt Nam được phát hiện vào năm 1925 trên một bệnh nhân nữ đang mang thai tháng thứ năm, sống tại Thủ Đức, Sài Gòn (Tp HCM ngày nay). Sau 6 ngày xuất hiện các triệu chứng, bệnh nhân bị sảy thai và sau 14 ngày phát bệnh, bệnh nhân tử vong (Pons and Advier, 1927). *B. pseudomallei* được phân lập từ bệnh phẩm máu tại Viện Pasteur Tp HCM và được định danh tại Viện Nghiên cứu Y khoa, Malaysia (Stanton and Fletcher, 1927).

Các ca nhiễm melioidosis sau đó được phát hiện bởi Menard vào năm 1928 ở Tp HCM và năm 1930 ở Hà Nội (Pons, 1930). Sau đó, các trường hợp nhiễm melioidosis được xác nhận bằng nuôi cấy, bao gồm các trường hợp liên quan đến tai nạn giao thông, đã được công bố ở Huế và một số tỉnh miền Bắc (Vaucel, 1937). Năm 1947, 28 ca nhiễm melioidosis cấp tính, bán cấp tính và mạn tính đã được mô tả ở các bệnh viện khác nhau tại miền Nam (Alain et al., 1949). Trong số đó, chỉ có 9 trường hợp là bệnh nhân Việt Nam, số còn lại gồm 15 bệnh nhân da trắng, 2 bệnh nhân da màu, 1 bệnh nhân người Trung Quốc và 1 bệnh nhân gốc Nam Á. Số ca tử vong được báo cáo là 19/28 bệnh nhân, song kết quả điều trị không được ghi nhận ở tất cả bệnh nhân. Từ năm 1951-1953, 5 trường hợp viêm phổi do melioidosis đã được chẩn đoán tại các bệnh viện ở miền Nam Việt Nam và ở Pháp. Tất cả các trường hợp này đều là công dân Pháp từng cư trú hoặc đóng quân tại các khu vực

Việt Nam, Lào và Campuchia (Duroux, 1965). Một trường hợp viêm phổi mạn tính do melioidosis cũng được mô tả ở một người lính bị thương ở ngực do trúng đạn ở Việt Nam (Guillermant et al., 1964). Từ năm 1948-1954, khoảng 100 ca nhiễm melioidosis đã được báo cáo trong số 400.000 quân Pháp đóng tại Việt Nam, Lào và Campuchia (Sanford, 1978). Năm 1956, một trường hợp tử vong do melioidosis nhiễm trùng huyết được chẩn đoán ở một người lính của quân đội miền Nam Việt Nam 40 tuổi nhập bệnh viện Cộng Hòa (Stein et al., 1958).

Đáng chú ý là vào năm 1967, Duong Hoang Mo và Tran Hiep Cuong đã đưa ra nhận định melioidosis rất có thể bị chẩn đoán sai ở các bệnh viện miền Nam Việt Nam và đã có những ca nhiễm melioidosis bị chẩn đoán thành bệnh lao hoặc nhiễm nấm lan tỏa (Duong Hong Mo and Tran Hiep Cuong, 1967). Khi quân đội Hoa Kỳ vào Việt Nam, melioidosis bắt đầu được phát hiện ở các quân nhân Hoa Kỳ. Diamond và Pastore (1967) công bố cho đến tháng 2 năm 1967, 35 trường hợp quân nhân Hoa Kỳ đóng quân ở Đông Nam Á được chẩn đoán nhiễm melioidosis, trong đó có 8 trường hợp tử vong (Diamond and Pastore, 1967). Những bệnh nhân này được chẩn đoán tại các bệnh viện hiện đại của Việt Nam Cộng hòa hoặc Hoa Kỳ, nơi có các phòng xét nghiệm vi sinh khá tốt để chẩn đoán melioidosis cũng như các bệnh truyền nhiễm khác.

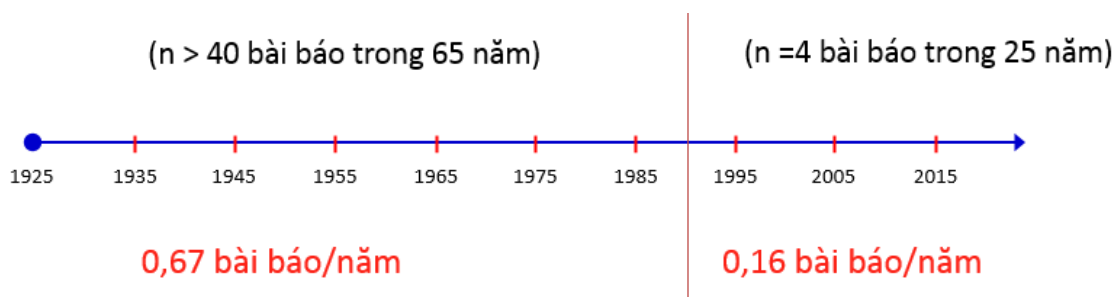
Trong năm 1966, một chùm ca bệnh gồm 9 trường hợp nhiễm melioidosis phổi ở quân nhân Hoa Kỳ đã được mô tả (Spotnitz et al., 1967). Ngoài ra, 9 trường hợp quân nhân Hoa Kỳ khác nhiễm melioidosis, trong đó có bốn trường hợp tử vong, được chẩn đoán tại Long Bình, Việt Nam (nay là tỉnh Đồng Nai) (Weber et al., 1969). Sau đó ngày càng nhiều trường hợp quân nhân Hoa Kỳ nhiễm melioidosis được báo cáo, nên nhiễm trùng melioidosis trở thành một trong 6 bệnh truyền nhiễm nhiệt đới chính mà các bác sĩ Hoa Kỳ đề chỉ số nghi ngờ cao ở những người lính bị sốt trở về từ Việt Nam (Deller, 1969). Từ tháng 4/1965-12/1969, 187 trường hợp nhiễm melioidosis với 13 ca tử vong đã được báo cáo trong các quân nhân Hoa Kỳ đóng tại Việt Nam. Cho đến khi Hoa Kỳ rút quân khỏi Việt Nam vào năm 1972, khoảng 2-3 trường hợp nhiễm melioidosis đã được phát hiện trong số các quân nhân Hoa Kỳ bằng phương pháp nuôi cấy mỗi tháng (Sanford and Moore, 1971; Everett and Nelson, 1975; Sanford, 1978).

Xét nghiệm IHA cho thấy 8,9% huyết thanh của các cựu quân nhân Hoa Kỳ từng đóng quân tại Việt Nam có hiệu giá từ 1:40 trở lên (Clayton et al., 1973). Dựa trên dữ liệu này, Clayton và cs (1973) đã ước tính rằng khoảng 250.000 trong số 3 triệu quân nhân Hoa Kỳ đã bị nhiễm *B. pseudomallei* khi phục vụ tại chiến trường Việt Nam (Clayton et al., 1973; Morrison et al., 1988). Mặc dù những ước tính này có thể chưa chính xác do hạn chế về độ nhạy và đặc hiệu của xét nghiệm IHA, nhưng nghiên cứu đã chỉ ra ổ nhiễm trùng *B. pseudomallei* tiềm ẩn trong số những quân nhân trở về từ Việt Nam. Thực tế nhiều bằng chứng cho thấy nhiễm trùng tiềm ẩn và tái nhiễm với vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể vẫn xảy ra sau nhiều năm (Koponen et al., 1991), dẫn đến biệt danh cho melioidosis là “Quả bom hẹn giờ Việt Nam”. Khả năng lây truyền từ người sang người qua quan hệ tình dục đã được đề xuất ở người vợ bị nhiễm melioidosis có chồng là một cựu quân nhân Hoa Kỳ trở về từ Việt Nam bị viêm tuyến tiền liệt do nhiễm *B. pseudomallei* (McCormick et al., 1975). Melioidosis cũng được chẩn đoán ở trẻ sơ sinh có bố từng phục vụ tại Việt Nam mặc dù con đường lây nhiễm vẫn chưa rõ ràng (Osteraas et al., 1971). Mặc dù số lượng lớn các trường hợp nhiễm melioidosis liên quan đến Việt Nam trong thời gian này được công bố, nhưng rất ít thông tin về căn bệnh này được báo cáo trên người Việt bản địa (Bảng 1.2).

**Bảng 1.2.** Số lượng người Việt Nam bản địa nhiễm melioidosis và kết quả điều trị được công bố trên các tạp chí y khoa (Trung et al., 2018)

Năm công bố	Số lượng bệnh nhân	Số ca khỏi bệnh	Số ca tử vong	Số ca không có thông tin	TLTK
1926	1	0	1	0	Pons and Advier, 1927
1949	9	5	0	4	Alain et al., 1949
1958	1	0	1	0	Stein et al., 1958
1967	1	1	0	0	Duong Hong Mo and Tran Hiep Cuong, 1967
1995	7	1	6	0	Van Phung et al., 1995
1990	1	1	0	0	Worthington and McEntry, 1990
1999	9	0	0	9	Parry et al., 1999
2008	55	32	17	6	Phuong et al., 2008
2018	70	30	18	22	Trung et al., 2018

Sau ngày giải phóng, các nghiên cứu và công bố khoa học về melioidosis ở Việt Nam được báo cáo rất ít. Tính đến thời điểm năm 2014 (trước lúc dự án RENOMAB triển khai), số lượng báo cáo ca bệnh ở Việt Nam đăng tải trên các tạp chí y học quốc tế giảm rõ rệt, ít hơn 4,2 lần/năm so với thời kỳ trước ngày giải phóng (Hình 1.5). Năm 1993, Phung và cs đã công bố 6,4-31,8% người dân thuộc các vùng dân cư sống ở ngoại thành Hà Nội có huyết thanh dương tính với xét nghiệm IHA. Nghiên cứu này cũng chỉ ra mối liên quan giữa tỷ lệ huyết thanh dương tính với melioidosis và nghề trồng lúa (Van Phung et al., 1993). Năm 1999, một nghiên cứu hồi cứu ở miền Nam công bố chỉ có 9 trường hợp được xác định nhiễm melioidosis từ 3.653 ca cấy máu của bệnh nhân sốt nhập viện tại bệnh viện bệnh nhiệt đới lớn nhất Tp HCM từ năm 1992-1998 (Parry et al., 1999), tuy nhiên, phác đồ và kết quả điều trị của các bệnh nhân không được báo cáo. Cũng tương tự, điều tra hồi cứu từ năm 1997 đến năm 2005 cũng chỉ phát hiện 55 ca nhiễm melioidosis nhập viện và điều trị tại bệnh viện Bạch Mai. Dựa vào địa chỉ cư trú của các bệnh nhân, nghiên cứu kết luận melioidosis phân bố rộng và xảy ra ở ít nhất 18 trong số 25 tỉnh phía Bắc (Phuong et al., 2008).



**Hình 1.5.** Số liệu bài báo Quốc tế công bố về *B. pseudomallei* và melioidosis tại Việt Nam từ lúc phát hiện ra ca bệnh đầu tiên năm 1925 đến thời điểm kết thúc chiến tranh năm 1975, dư âm ca bệnh công bố sau chiến tranh và những năm hòa bình lập lại (Trung et al., 2018)

Thông qua dự án RENOMAB, TS. Trịnh Thành Trung và cs đã đến gần 40 bệnh viện đa khoa tuyến tỉnh/khu vực ở 26 tỉnh/thành của cả nước để giảng bài về melioidosis và hướng dẫn quy trình xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn *B. pseudomallei* từ các mẫu bệnh phẩm. Kết quả rất khác biệt, hơn 30 BVĐK tỉnh/khu vực trước đây chưa từng ghi nhận bất kỳ một ca nhiễm melioidosis nào thì nay đã xác định được những ca đầu tiên. Hơn nữa, số lượng ca nhiễm bệnh ở một số bệnh viện cao hơn rất nhiều so với dự đoán trước đó. Tại 5 tỉnh Bắc Trung Bộ, chỉ trong vòng 7 tháng (6-



12/2015) đã phát hiện ra 70 ca bệnh, trong đó 18 ca (25,7%) tử vong tại bệnh viện, 11 ca (15,7%) bệnh chuyển nặng và người nhà bệnh nhân “xin về”, 11 ca (15,7%) chuyển tuyến nên không rõ kết quả điều trị (Trung et al., 2017). Nghiên cứu công bố tỷ lệ phát hiện *B. pseudomallei* dao động từ 3,4-10,2% trong số các mẫu cấy máu dương tính tại các bệnh viện. 58/70 bệnh nhân melioidosis nhiễm trùng huyết. Cùng với đó, nghiên cứu điều tra năm 2008 cho thấy, số lượng bệnh nhân melioidosis nhiễm khuẩn huyết tử vong tại bệnh viện tuyến cuối là 42,5% (Phuong et al., 2008). Điều đó cho thấy tỷ lệ tử vong trên bệnh nhân nhiễm melioidosis tại Việt Nam là rất cao, với tỷ lệ ước tính khoảng 50%.

Mặc dù RENOMAB đã đạt được những kết quả quan trọng và hoạt động nghiên cứu về melioidosis đã được chú ý, nhưng số lượng ca bệnh phát hiện ở nước ta còn rất khiêm tốn, thấp hơn nhiều so với các nước trong cùng khu vực địa lý (Bảng 1.3). Theo dự báo, mỗi năm ở Việt Nam có khoảng 10.430 ca nhiễm melioidosis và con số tử vong khoảng 4.703 ca (Limmathurotsakul et al., 2016). Tuy nhiên, số liệu báo cáo từ 38 bệnh viện ở 26 tỉnh/thành tham gia trong dự án RENOMAB cho thấy số lượng ca melioidosis phát hiện ở nước ta trung bình chỉ khoảng 110 ca/năm (Trung et al., 2018), thấp hơn khoảng 100 lần so với con số dự báo.

**Bảng 1.3.** Số lượng ca melioidosis thực tế và số lượng ca dự báo ở một số quốc gia Đông Nam Á (Limmathurotsakul et al., 2016)

Quốc gia	Diện tích (nghìn km <sup>2</sup> )	Dân số (triệu dân)	Dự đoán số ca nhiễm hàng năm	Số ca thực tế hàng năm	Số lần ít hơn so với dự đoán *
Thái Lan	513	67	7.572	4.300	1,76
Campuchia	176	16	2.083	450	4,6
Lào	230	7	420	170	2,47
Việt Nam	331	96	10.430	110	94,81

\* Được tính dựa trên số ca dự đoán chia cho số ca ghi nhận thực tế

Vì vậy, các nghiên cứu khoa học nhằm nâng cao hơn nữa tính cảnh giác về căn bệnh nguy hiểm này tới đội ngũ bác sĩ điều trị; nâng cao năng lực xét nghiệm chẩn đoán bệnh ở các bệnh viện tuyến; nâng cao hiệu quả điều trị và hiệu quả dự

phòng (bao gồm cảnh báo đối tượng có nguy cơ nhiễm bệnh và cảnh báo khu vực lưu hành vi khuẩn *B. pseudomallei*) là việc làm vô cùng cấp thiết nhằm giảm thiểu số lượng người dân nhiễm bệnh và giảm tỷ lệ tử vong đáng tiếc ở người bệnh. Đặc biệt hơn nữa, việc nghiên cứu phát triển các test kit đơn giản, có thể sử dụng được ở các bệnh viện tuyến tỉnh, khu vực và tuyến huyện sẽ giúp bệnh nhân sớm được chẩn đoán khẳng định bệnh và được sử dụng kháng sinh hợp lý để kiểm soát và điều trị bệnh, giảm tình trạng diễn tiến nguy hiểm và tử vong.

### 1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM VI KHUẨN *B. pseudomallei* TỪ MẪU BỆNH PHẪM LÂM SÀNG

#### 1.3.1. Các phương pháp xét nghiệm phụ thuộc nuôi cấy

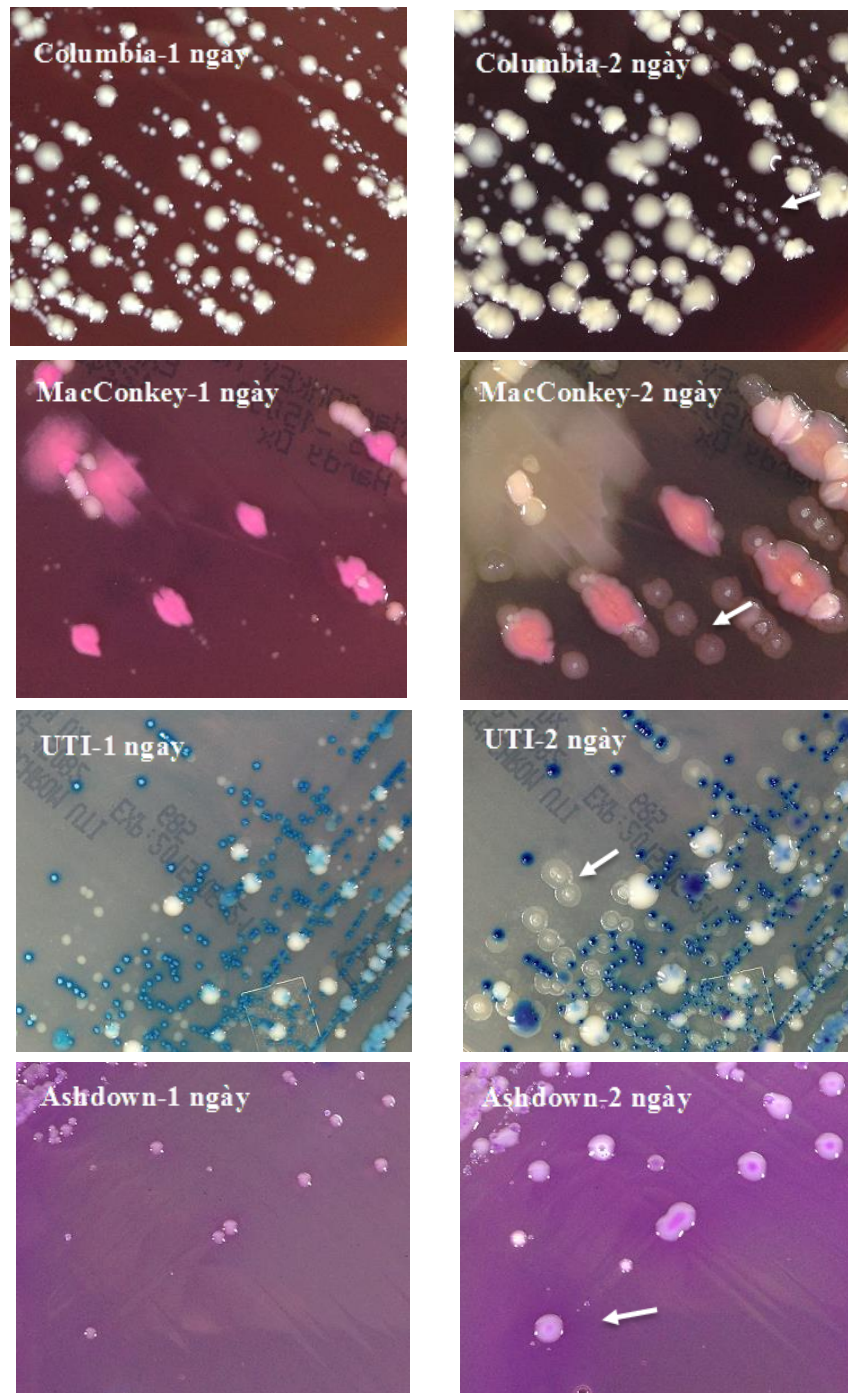
**Nguyên lý chung:** Chủng vi khuẩn thuần khiết được phân lập từ mẫu bệnh phẩm và sau đó được định danh.

Bệnh phẩm được nuôi cấy trực tiếp trên môi trường đĩa thạch thường quy hoặc chọn lọc Ashdown nhằm phân lập khuẩn lạc vi khuẩn nghi ngờ là *B. pseudomallei*. Đối với các bệnh phẩm tạp nhiễm, bước làm giàu trong môi trường dịch thể chọn lọc sẽ được thực hiện trước khi cấy trải trên đĩa thạch Ashdown. Sau đó, các khuẩn lạc nghi ngờ *B. pseudomallei* sẽ được định danh bằng các kỹ thuật khác nhau, tùy điều kiện của phòng xét nghiệm.

##### 1.3.1.1. Định danh *B. pseudomallei* bằng hình thái khuẩn lạc và tế bào

Việc nuôi cấy thường quy vi khuẩn *B. pseudomallei* trong các phòng xét nghiệm vi sinh gặp rất nhiều khó khăn do vi khuẩn có tốc độ sinh trưởng chậm, dẫn đến bị các loài vi khuẩn sinh trưởng nhanh lấn át và thường bị bỏ sót. Ngoài ra, ở nhiều phòng xét nghiệm vi sinh tại Việt Nam, đĩa phân lập vi khuẩn thường được đọc kết quả sau 24 giờ nuôi cấy, nhưng tại thời điểm này khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* thường rất nhỏ và khó phát hiện (Hình 1.6). Hơn nữa, khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* có hình thái đa dạng dẫn đến nhầm lẫn trong việc nhận dạng khuẩn lạc. Chantratita và cs (2007) đã đánh giá đặc điểm hình thái của 212 chủng *B. pseudomallei* khi nuôi trên môi trường thạch Ashdown và bắt gặp 7 kiểu hình thái khuẩn lạc chính từ trơn nhẵn đến nhẵn nheo và khô ráp quan sát ở vi khuẩn sau 4 ngày nuôi cấy tại 37°C trong điều kiện hiếu khí. Trong đó, 25 chủng biểu hiện 1 kiểu hình thái, 22 chủng có 2 kiểu hình thái, 2 chủng có 3 kiểu hình thái và 1 chủng có 4 kiểu hình thái. Như vậy, nếu đặc điểm hình thái được dùng làm căn cứ để xác

định chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* thì 212 chủng ban đầu đã trở thành “241” chủng (Chantratita et al., 2007).



**Hình 1.6.** Khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* và các loài vi khuẩn khác phân lập từ mẫu bệnh phẩm tạp nhiễm trên các môi trường thường quy (Columbia, MacConkey và UTI) và chọn lọc (Ashdown) trong thời gian 1-2 ngày, 37°C. Mũi tên chỉ khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* (phòng Vi sinh y học, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN)

Tại Việt Nam, xét nghiệm chẩn đoán melioidosis bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh được hướng dẫn trong Giáo trình Vi sinh vật Y học (Lê Huy Chính, 2007) và Quyết định 6101/QĐ-BYT ngày 30/12/2019 của Bộ Y tế. Cụ thể, mẫu bệnh phẩm từ các ổ kín được nuôi cấy trên các môi trường thường quy, trong khi mẫu bệnh phẩm tạp nhiễm được cấy trên môi trường chọn lọc Ashdown bổ sung kháng sinh Gentamicin. Tuy nhiên, các đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc vi khuẩn *B. pseudomallei* chỉ được mô tả gồm khuẩn lạc màu trắng đục hoặc màu kem, bề mặt khô và nhăn nheo, bờ răng cưa. Tác giả cũng lưu ý trên cùng một đĩa nuôi cấy một chủng *B. pseudomallei* có thể tạo thành các kiểu hình dạng và kích thước khuẩn lạc khác nhau. Vi khuẩn không tiết sắc tố ra môi trường và thường có mùi hương đặc biệt giống như mùi nho. Tế bào *B. pseudomallei* là có dạng trực khuẩn hoặc cầu-trực khuẩn Gram âm, bắt màu đậm ở hai cực khi nhuộm Gram, thường có hình dạng như chiếc kim băng, kích thước 0,8-1,5  $\mu\text{m}$ , không sinh bào tử (Lê Huy Chính, 2007).

Do sự đa dạng về kiểu hình, một chủng có thể có hơn một kiểu hình thái khuẩn lạc trên cùng đĩa nuôi cấy, nên việc nhận dạng *B. pseudomallei* đòi hỏi kỹ thuật viên xét nghiệm phải được đào tạo và có nhiều kinh nghiệm thao tác trên đối tượng vi khuẩn *B. pseudomallei*.

#### 1.3.1.2. Định danh *B. pseudomallei* bằng phương pháp thường quy

**Nguyên lý:** Các hệ thống định danh *B. pseudomallei* thường quy được sử dụng rộng rãi trong các phòng xét nghiệm như API 20NE (BioMerieux), VITEK 2 (BioMerieux), Phoenix (Becton, Dickinson and Company) và MicroScan WalkAway 96 (Siemens). Nguyên lý hoạt động của hệ thống định danh này là dựa trên đặc tính sinh lý, sinh hóa cũng như khả năng phân giải cơ chất của vi sinh vật. Xét nghiệm yêu cầu chủng vi khuẩn thuần khiết và lượng đủ lớn, thời gian thường kéo dài từ 12-48 giờ tùy mức độ sinh trưởng của vi khuẩn (Bảng 1.4).

**Bảng 1.4.** Các phương pháp thường quy định danh *B. pseudomallei*

TT	Hệ thống định danh	Ưu điểm	Nhược điểm	TLTK
1	API 20NE	Độ chính xác có thể đến 93%	Thời gian xét nghiệm lâu (24-48 giờ), có thể định danh sai một số chủng, độ chính xác phụ thuộc vào kỹ thuật viên xét nghiệm.	Zong, 2012
2	VITEK	Thời gian xét nghiệm nhanh	Độ chính xác phụ thuộc vào phiên bản huỳnh quang (19%), so màu (63-81%); sự cập nhật của cơ sở dữ liệu; môi trường nuôi cấy.	Lowe et al., 2002; Lowe et al., 2006, Kiratisin et al., 2007 ; Deepak et al., 2008
3	Phoenix	Thời gian xét nghiệm nhanh	Định danh nhầm thành <i>B. cepacia</i> , phụ thuộc sự cập nhật của cơ sở dữ liệu.	Koh et al., 2003
4	MicroScan WalkAway 96	Thời gian xét nghiệm nhanh. Độ chính xác cao (96%)	Không phân biệt được <i>B. pseudomallei</i> và <i>B. cepacia</i>	Kiratisin et al., 2007

### 1.3.1.3. Định danh *B. pseudomallei* bằng phương pháp phân tử

Trong hơn một thập kỷ qua, MALDI-TOF MS đã được biết đến như một cuộc cách mạng kỹ thuật trong định danh nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh với chi phí thấp hơn các kỹ thuật xét nghiệm thường quy đang sử dụng tại các phòng xét nghiệm. MALDI-TOF dựa trên kỹ thuật ion hóa bằng cách giải phóng hợp chất ra khỏi chất mang bằng tia laser. Các ion khác nhau sẽ được phân tách nhờ sự khác nhau về thời gian bay (TOF) và đầu dò của máy sẽ phân biệt được các ion. Dựa trên thông tin TOF, một phổ đặc trưng gọi là PMF (đặc trưng khối peptide) được tạo ra cho mẫu phân tích. Việc định danh vi khuẩn được thực hiện bằng cách so sánh PMF của loài chưa biết với PMF có trong cơ sở dữ liệu hoặc bằng cách so sánh với cơ sở dữ liệu về hệ protein. MALDI-TOF MS được chứng minh hiệu quả trong xác định các loài trực khuẩn Gram âm không lên men bao gồm một số loài *Burkholderia*, trong đó có *B. pseudomallei* (Lau et al., 2012; Lau et al., 2015). Hiện nay, MALDI-TOF MS được đánh giá là một công cụ linh hoạt

và hiệu quả để xác định nhanh *B. pseudomallei* nếu cơ sở dữ liệu phù hợp và liên tục được cập nhật (Wang et al., 2016).

Phân tích trình tự gen rRNA 16S là một phần không thể thiếu trong định danh nhiều chi vi khuẩn, nhưng việc sử dụng gen này trong phân loại chi *Burkholderia* có nhiều hạn chế, đặc biệt là các loài *B. cepacia* complex. Trong khi đó, gen *recA* đã được sử dụng rộng rãi trong các hệ thống phân loại vi khuẩn (Karlín et al., 1995) và là công cụ hiệu quả trong định danh các loài *B. cepacia* complex (Mahenthiralingam et al., 2000). Payne và cs (2005, 2006) đã chứng minh gen *recA* có khả năng phân loại 17 loài thuộc *B. cepacia* complex với cặp môi tối ưu BUR1 và BUR2 (Payne et al., 2005, 2006).

Bên cạnh phân tích trình tự gen, các phương pháp sinh học phân tử khác cũng được nghiên cứu để định danh *B. pseudomallei*. Novak và cs (2006) đã phát triển phương pháp real-time PCR không chỉ dựa trên tính đặc hiệu lý thuyết mà còn dựa vào sự đa dạng phân bố của các chủng. Đoạn trình tự đích có kích thước 115 bp thuộc gen *orf2* của cụm TTSS1 có thể phân biệt *B. pseudomallei* với các loài vi sinh vật khác. Real-time PCR *orf2* đã được đánh giá trên 224 chủng *B. pseudomallei* đa dạng về phân bố địa lý và đặc điểm lâm sàng và đạt được độ đặc hiệu là 100% (Novak et al., 2006).

Năm 2020, kỹ thuật PCR đẳng nhiệt (insulated isothermal PCR- iiPCR) khuếch đại gen đích *bimA* (BPSS1492) để định danh *B. pseudomallei* đã được Chua và cs (2020) phát triển. Hai kỹ thuật iiPCR *bimA* và real-time PCR *bimA* đã được tiến hành song song để định danh 121 chủng *B. pseudomallei* lâm sàng và 10 chủng non-*B. pseudomallei*. Kết quả cho thấy tất cả 121 chủng *B. pseudomallei* dương tính với real-time PCR trong khi 118 chủng dương tính với iiPCR và không kỹ thuật nào phản ứng dương tính giả với 10 chủng non-*B. pseudomallei* (Chua et al., 2020). Thông tin về các phương pháp phân tử dùng trong định danh *B. pseudomallei* được tóm tắt tại Bảng 1.5.

**Bảng 1.5.** Các phương pháp phân tử dùng trong định danh *B. pseudomallei*

TT	Phương pháp	Nguyên lý	Ưu điểm	Nhược điểm	TLTK
1	MALDI-TOF MS	Ion hóa protein, tạo phổ đặc trưng, so sánh với phổ đã biết	Thời gian nhanh (< 1 giờ); giá thành rẻ; độ chính xác cao	Thiết bị đắt tiền, phụ thuộc cơ sở dữ liệu	Wang et al., 2016
2	Giải trình tự gen	So sánh trình tự gen 16S rRNA hoặc recA của vi khuẩn với cơ sở dữ liệu	Độ chính xác cao	Thời gian xét nghiệm lâu, giá thành cao	Payne et al., 2005, 2006
3	Real-time PCR	Môi và đầu dò được thiết kế dựa trên gen đích TTSS1	Độ chính xác cao, thời gian xét nghiệm ngắn (<3 giờ)	Yêu cầu về thiết bị và trình độ nhân lực	Novak et al., 2006
4	iiPCR	Khuếch đại gen đích <i>bimA</i>	Độ đặc hiệu cao	Có thể dương tính giả, yêu cầu về trình độ nhân lực	Chua et al., 2020

#### 1.3.1.4. Định danh *B. pseudomallei* bằng phương pháp miễn dịch

Steinmetz và cs (1999) đã phát triển kỹ thuật xét nghiệm ngưng kết miễn dịch latex sử dụng kháng thể đơn dòng MAb3015 IgG1 và đánh giá hiệu quả trong định danh nhanh các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ các vùng địa lý khác nhau gồm Đông Nam Á, Úc và châu Phi. Kết quả cho thấy 74/74 (100%) chủng *B. pseudomallei* cho phản ứng dương tính nhanh và mạnh mẽ với ngưng kết latex MAb3015, 56/56 (100%) chủng non-*B. pseudomallei* cho phản ứng âm tính (Steinmetz et al., 1999). Năm 2014, nhóm nghiên cứu thuộc Đại học Mahidol Thái Lan cũng phát triển thành công và thương mại latex test sử dụng kháng thể đơn dòng MAb4B11 để định danh nhanh *B. pseudomallei*. Kết quả xét nghiệm cho thấy, 76/77 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phản ứng dương tính với latex test, độ nhạy 98,7% (Duval et al., 2014). Sau đó, Songsri và cs (2018) đã đánh giá hiệu quả sử

dụng của latex test MAb4B11 trên các chủng vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* phân lập từ môi trường, và công bố chủng *B. thailandensis* CDC3015869 phản ứng chéo với latex test MAb4B11 (Songsri et al., 2018). Gần đây, Hantrakun và cs (2018) đã phát hiện nhóm các chủng vi khuẩn *B. thailandensis* có khả năng sinh kháng nguyên CPSs giống với *B. pseudomallei*-được đặt tên là BTCV (*B. pseudomallei*-like capsular polysaccharide) (Hantrakun et al., 2018). Phát hiện này cho thấy sự hạn chế của latex test trong phân biệt các chủng *B. pseudomallei* và *B. thailandensis* phân lập từ môi trường (Songsri et al., 2018).

### 1.3.2. Các phương pháp xét nghiệm melioidosis không phụ thuộc nuôi cấy

#### 1.3.2.1. Xét nghiệm melioidosis bằng phương pháp sinh học phân tử

Mặc dù nuôi cấy là “tiêu chuẩn vàng” cho xét nghiệm melioidosis từ mẫu bệnh phẩm nhưng thời gian xét nghiệm lâu, kết quả xét nghiệm thường được trả sau 4-7 ngày, do đó làm chậm việc sử dụng đúng kháng sinh trong điều trị bệnh, trong khi vi khuẩn *B. pseudomallei* kháng với nhiều loại kháng sinh đầu tay sử dụng trong điều trị các bệnh truyền nhiễm. Do vậy xét nghiệm chẩn đoán nhanh sẽ giúp điều trị sớm bằng kháng sinh thích hợp và giảm tỷ lệ tử vong (White, 2003). Nhiều kỹ thuật PCR phát hiện nhanh *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm đã được các nhà khoa học Úc và Thái Lan phát triển (Haase et al., 1998; Kunakorn et al., 2000; Gal et al., 2005; Supaprom et al., 2007; Meumann et al., 2006). Thông tin được tóm tắt tại Bảng 1.6.

**Bảng 1.6.** Các phương pháp sinh học phân tử trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm

TT	Phương pháp	Ưu điểm	Nhược điểm	Kết luận	TLTK
1	PCR gen 16S rRNA, rRNA spacer và LPS	Độ đặc hiệu của PCR gen LPS cao 100%	Độ nhạy của 3 kỹ thuật thấp <50%, độ đặc hiệu PCR gen 16S rRNA và rRNA spacer thấp < 60%	Không phù hợp cho chẩn đoán melioidosis từ mẫu bệnh phẩm.	Kunakorn et al., 2000
2	Real-time PCR TTSS1	Độ nhạy và độ đặc hiệu 100% đối với các mẫu	Độ nhạy rất thấp đối với bệnh phẩm	Chỉ phù hợp với bệnh phẩm có mật độ vi khuẩn	Meumann et al., 2006



		bệnh phẩm đờm, nước tiểu, mủ dẫn lưu và gạc vết thương	máu, ngoại trừ máu của bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn huyết	cao	
3	Real-time PCR 8653 và 9438	Độ nhạy lần lượt là 71% và 54%; và độ đặc hiệu lần lượt là 82% và 88% trên bệnh phẩm máu.	-	Có thể là công cụ phân tử phát hiện nhanh <i>B. pseudomallei</i> sử dụng trong chẩn đoán sớm	Supaprom et al., 2007
4	LAMP BPSS 1406 (TTSS1)	Độ đặc hiệu 98,4%.	Độ nhạy 44%	Không đủ độ nhạy để xét nghiệm melioidosis	Chantratita et al., 2008

#### 1.3.2.2. Xét nghiệm melioidosis bằng phương pháp miễn dịch

Xét nghiệm nhanh bằng kỹ thuật ngưng kết hồng cầu gián tiếp (indirect hemagglutination assay - IHA) phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* trong huyết thanh của người bệnh đã được phát triển từ năm 1965 và được sử dụng phổ biến trong các bệnh viện. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu công bố độ nhạy và đặc hiệu của phương pháp IHA không cao, có thể cho kết quả dương tính giả do phản ứng chéo với một số kháng nguyên từ các loài có quan hệ gần gũi với *B. pseudomallei* như *B. mallei* và *B. thailandensis* (Tiyawisutsri et al., 2005; Gilmore., 2007). Vì vậy, phương pháp IHA chỉ dùng để xác định khả năng phơi nhiễm với vi khuẩn *B. pseudomallei* chứ không có giá trị chẩn đoán melioidosis vì tỷ lệ huyết thanh dương tính với IHA của người dân sinh sống trong vùng dịch bệnh lưu hành là rất cao.

ELISA là một kỹ thuật xét nghiệm nhanh, có độ nhạy cao để phát hiện sự có mặt của protein đặc hiệu trong mẫu cần phân tích (Hara et al., 2013). Trong xét nghiệm melioidosis, nhiều nghiên cứu đã công bố kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Các công bố được tóm tắt tại Bảng 1.7.

**Bảng 1.7.** Các kỹ thuật ELISA trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm

TT	Kỹ thuật	Ưu điểm	Nhược điểm	Kết luận	TLTK
1	ELISA-dịch chiết môi trường nuôi cấy <i>B. pseudomallei</i>	IgG-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu (96% và 94%) cao hơn IgM-ELISA (74% và 99%)	-	IgG-ELISA được định hướng ứng dụng trong chẩn đoán melioidosis	Chenthamarakshan et al., 2001
2	ELISA-kháng nguyên thô/ EPS/ LPS	ELISA-kháng nguyên thô đạt độ nhạy là 81%, độ đặc hiệu là 70%	ELISA-EPS và LPS cho độ nhạy thấp, tương ứng 65 và 77%	-	Chantratita et al., 2007
3	ELISA-Hcp1 / Omp3/ smBpF4/ Omp85	Cả 4 kháng nguyên đều có độ đặc hiệu cao từ 89-96%.	ELISA-Hcp1 / Omp3/ smBpF4/ Omp85 có độ nhạy thấp (<71%)	Tổ hợp ELISA-(Hcp1, Omp3, smBpF4, Omp85) có độ nhạy 88,2%, và độ đặc hiệu 96%.	Hara et al., 2013
4	ELISA-Hcp1	Độ nhạy và đặc hiệu trên 90%	-	Hcp1 được sử dụng để sản xuất que test LFI	Chieng et al., 2015; Pumpuang et al., 2017
5	ELISA-GroEL/ OmpA	ELISA- GroEL đạt độ nhạy là 92%, độ đặc hiệu của 2 xét nghiệm này lần lượt là 88% và 90%.	ELISA-OmpA chỉ đạt độ nhạy là 76%	GroEL có tiềm năng trong phát triển xét nghiệm chẩn đoán nhanh melioidosis	Kritsiriwuthinan et al., 2018

### 1.3.2.3. Xét nghiệm melioidosis bằng que xét nghiệm nhanh sắc ký miễn dịch

Kế thừa kết quả từ quá trình nghiên cứu tìm kiếm các kháng nguyên có độ nhạy và đặc hiệu cao trong xét nghiệm melioidosis, các nhóm nghiên cứu tại Mỹ, Thái Lan và Đức đã phát triển thành công các que test nhanh sắc ký miễn dịch xét nghiệm melioidosis từ mẫu bệnh phẩm với độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Houghton et al., 2014; Peeters et al., 2018; Phokrai et al., 2018; Felgner et al., 2009; Kohler et

al., 2016; Wagner et al., 2020). Thông tin về các que test nhanh được trình bày ở Bảng 1.8. Hiện nay, ba sản phẩm trên vẫn đang trong quá trình nghiên cứu và phát triển, chưa được thương mại hóa, do vậy chưa chính thức được sử dụng cho xét nghiệm melioidosis tại các bệnh viện.

**Bảng 1.8.** Các loại que test nhanh trong xét nghiệm melioidosis từ bệnh phẩm

Que test	Nguyên lý	Thông tin	TLTK
InBiOS AMD	Sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CPS trên bề mặt tế bào vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn trong bệnh phẩm	Phát hiện vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> trong chai nuôi cấy máu với độ nhạy và đặc hiệu tương ứng là 96,5% và 100%. Ứng dụng chẩn đoán melioidosis từ bệnh phẩm máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, đờm, mủ, chai nuôi cấy máu và trực tiếp từ khuẩn lạc.	Houghton et al., 2014; Peeters et al., 2018
ICT	Sử dụng kháng nguyên OPS và Hcp1 để phát hiện kháng thể kháng vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> trong huyết thanh	Độ nhạy của ICT là 88,3%, độ đặc hiệu của ICT từ 86,1-100% tùy thuộc nhóm bệnh nhân. Hcp1-ICT hiện đang được xem như một xét nghiệm tại chỗ tiềm năng có thể thay thế cho IHA trong sàng lọc melioidosis ở các khu vực có nguồn lực hạn chế	Phokrai et al., 2018
Melioidosis DS test	Sử dụng kháng nguyên AhpC, GroEL1, GroEL và Hcp1 để phát hiện kháng thể kháng vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> trong huyết thanh	Melioidosis DS cho kết quả chính xác với khoảng pha loãng huyết thanh rộng (1:6-1:100), độ nhạy 92,0% và độ đặc hiệu 97,0% và 100% tùy thuộc nhóm bệnh nhân.	Felgner et al., 2009; Kohler et al., 2016; Wagner et al., 2020.

#### 1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *B. pseudomallei* NGOÀI MÔI TRƯỜNG

##### 1.4.1. Phương pháp nuôi cấy

Hiện nay phương pháp nuôi cấy vẫn được xem là “tiêu chuẩn vàng” trong xác định *B. pseudomallei* từ các mẫu lâm sàng hoặc môi trường (Cheng and Currie, 2005). Trong những ngày đầu phát hiện ra melioidosis, Whitmore đã sử dụng các môi trường khác nhau để nuôi cấy *B. pseudomallei* như thạch dinh dưỡng, nước chiết thịt, thạch với muối và gelatine, thạch glycerine và khoai tây (Whitmore and Krishnaswami, 1912). Kể từ đó, các phương pháp nuôi cấy *B. pseudomallei* đã phát

triển cùng với sự ra đời của các môi trường chọn lọc và đặc hiệu khác nhau (Bảng 1.9). Tất cả các môi trường nuôi cấy chọn lọc này được khuyến nghị sử dụng để làm giàu vi khuẩn, sau đó kết hợp với thạch Ashdown để phân lập *B. pseudomallei*. Đặc biệt, các mẫu bệnh phẩm tạp nhiễm như đờm, ngoáy họng, nước tiểu, mủ và mẫu môi trường như đất, nước sẽ được làm giàu trong các loại môi trường chọn lọc này trước khi phân lập trên thạch Ashdown (Ashdown, 1979; Galimand and Dodin, 1982; Wuthiekanun et al., 1995).

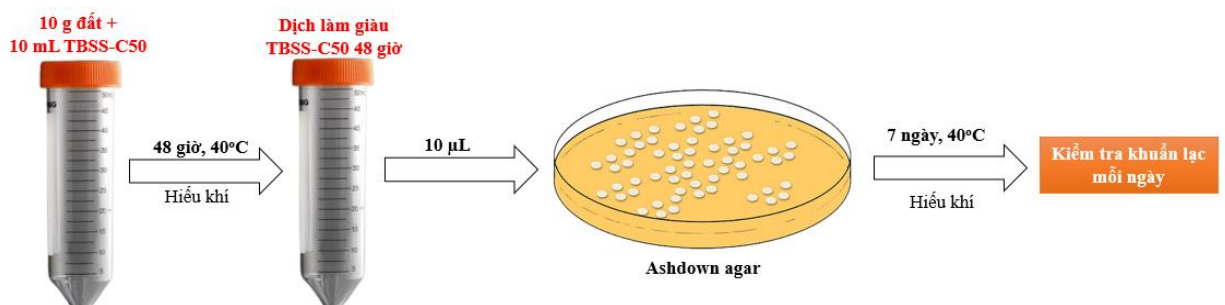
**Bảng 1.9.** Sự ra đời của các môi trường chọn lọc và đặc hiệu vi khuẩn *B. pseudomallei*

TT	Tên môi trường	Thành phần chính	Yếu tố cải tiến	Yếu tố chọn lọc	TLTK
1	Mac	MacConkey broth	Colistin-S* (colymycin)	Tím kết tinh 1 mg/L, colistin-S* 20 mg/L	Farkas-Himsley, 1968
2	Ashdown	Tryptone soya broth; glycerol	Tím kết tinh, đỏ trung tính	Gentamicin 4 mg/L, tím kết tinh 5 mg/L	Ashdown, 1979a
3	CVCB	Trypticase soy broth	Colistin 20	Tím kết tinh 5 mg/L và colistin 20 mg/L	Ashdown, 1979b
4	TBSS	Dung dịch đậm, L-threonine	-	Colistin 50 mg/L	Galimand and Dodin, 1982
5	CVC50	Trypticase soy broth	Colistin 50	Tím kết tinh 5 mg/L và colistin 50 mg/L	Wuthiekanun et al., 1995
6	BPSA	Glycerol, maltose	Gentamicin	Gentamicin 20 mg/L	Howard and Inglis, 2003
7	Francis	Tryptone soya broth, glycerol	Gentamicin	Gentamicin 8 mg/L, tím kết tinh 5 mg/L, bromocresol 0,2%	Francis et al., 2006

Nghiên cứu so sánh độ nhạy và độ đặc hiệu giữa môi trường Ashdown, BPSA và môi trường *Burkholderia cepacia* thương mại cho thấy, môi trường Ashdown có tính đặc hiệu cao hơn BPSA mặc dù có độ nhạy tương đương nhau (Peacock et al., 2005). Cho đến nay, thạch Ashdown vẫn là môi trường được sử dụng rộng rãi nhất để phân lập *B. pseudomallei* từ cả mẫu lâm sàng và môi trường.

Môi trường Ashdown tạo ra các khuẩn lạc *B. pseudomallei* màu tím đặc trưng, khô, và nhăn nheo. Thời gian nuôi cấy trên môi trường Ashdown phải đảm bảo 96 giờ vì gentamicin có thể có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của *B. pseudomallei*. Sử dụng môi trường dịch thể Ashdown bổ sung colistin nhằm làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể làm tăng độ nhạy của phương pháp nuôi cấy phân lập nhưng cũng làm tăng thời gian xét nghiệm chẩn đoán (Cheng et al., 2006).

Tại Hội nghị quốc tế lần thứ VI về melioidosis năm 2010, các nhà khoa học đã thành lập nhóm chuyên gia quốc tế về chủ đề “Phát hiện vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* ngoài môi trường” (Detection of Environmental *Burkholderia pseudomallei* Working Party, viết tắt là DEBWorP). Năm 2013, 16 nhà khoa học của DEBWorP đã tổng hợp, đánh giá và đưa ra hướng dẫn chuẩn trong nghiên cứu điều tra sự hiện diện của *B. pseudomallei* ngoài môi trường nhằm mục đích hạn chế kết quả âm tính giả và có thể áp dụng được ở các quốc gia nơi có bệnh dịch lưu hành (Limmathurotsakul et al., 2013). Theo hướng dẫn này, nuôi cấy là phương pháp chuẩn để phát hiện *B. pseudomallei* ngoài môi trường, do tính chất đơn giản, đặc hiệu và giá thành thấp nên có thể áp dụng được ở các nước đang phát triển (Hình 1.7). Nhiệt độ ủ 40°C đã được chọn dựa trên minh chứng cho thấy *B. pseudomallei* sinh trưởng tốt trong khi một số vi sinh vật đất khác bị ức chế. Tuy nhiên, nhiệt độ ủ 37°C có thể được chấp nhận trong trường hợp không có tủ ấm 40°C. Việc cấy trải 10 µL dịch làm giàu là dựa trên kinh nghiệm nghiên cứu ở Thái Lan và thể hiện sự cân bằng giữa việc phát hiện *B. pseudomallei* và hạn chế tạp nhiễm các vi sinh vật khác phát triển trên đĩa thạch. Việc nuôi cấy với thể tích lớn hơn (100 µL) có thể mang lại độ nhạy cao hơn mặc dù hiện tại không có bằng chứng được công bố để chứng minh điều này (Limmathurotsakul et al., 2013).



**Hình 1.7.** Sơ đồ các bước nuôi cấy phân lập phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường theo hướng dẫn chuẩn (Limmathurotsakul et al., 2013).

#### 1.4.2. Phương pháp sinh học phân tử

Mặc dù hướng dẫn chuẩn dựa trên phương pháp nuôi cấy đã có những thành công trong việc phát hiện *B. pseudomallei* trong các mẫu đất thu từ nhiều vùng tại Thái Lan, nhưng độ nhạy của nó không đồng đều. Việc không phân lập được *B. pseudomallei* không có nghĩa là loài vi khuẩn này không hiện diện tại khu vực nghiên cứu. Limmathurotsakul và cs (2016) đã phân tích tính phù hợp của môi trường đất và dự đoán *B. pseudomallei* tồn tại ở nhiều nơi trên thế giới, kể cả những nơi melioidosis chưa từng được báo cáo hoặc vi khuẩn chưa từng được phân lập (Limmathurotsakul et al. 2016).

Việc điều tra sự có mặt thực sự của vi khuẩn *B. pseudomallei* là rất quan trọng, không chỉ để xác định khu vực nguy cơ mà còn phục vụ điều tra dịch tễ và nguồn phát sinh bệnh. Nhiều nghiên cứu chứng minh phương pháp PCR có hiệu quả trong việc phát hiện *B. pseudomallei* ngoài môi trường với độ nhạy cao hơn đáng kể so với các phương pháp nuôi cấy (Kaestli et al., 2007; Trung et al., 2011; Göhler et al., 2017; Dance et al., 2018). Tuy nhiên, việc phát hiện DNA của *B. pseudomallei* trong mẫu môi trường chỉ là nhận định ban đầu về khu vực có nguy cơ. Ngoài ra, phương pháp PCR không thể thay thế cho việc phân lập được chủng vi khuẩn thuần khiết để phục vụ cho nghiên cứu độc lực, tính kháng thuốc và dịch tễ học phân tử. Do vậy, cách tiếp cận hợp lý hơn trong việc phát hiện *B. pseudomallei* ngoài môi trường được đề xuất kết hợp các bước (1) mẫu môi trường được nuôi cấy làm giàu, (2) sau đó dịch làm giàu được sàng lọc bằng PCR đặc hiệu *B. pseudomallei*, (3) dịch làm giàu dương tính với *B. pseudomallei* bằng PCR được cấy trải lên đĩa thạch chọn lọc để phân lập vi khuẩn (Dance et al., 2018).

Với những ghi nhận về tình hình nghiên cứu melioidosis nói trên, có thể thấy không chỉ ở Việt Nam mà ở nhiều quốc gia thuộc vùng dịch tễ trên thế giới, chẩn đoán melioidosis còn nhiều hạn chế, đặc biệt là kỹ thuật chẩn đoán còn bỏ sót và chưa đáp ứng nhu cầu chẩn đoán nhanh. Do vậy, nội dung thứ nhất trong nghiên cứu của luận án là phát triển kỹ thuật chẩn đoán sớm nhiễm trùng melioidosis. Bên cạnh đó, kỹ thuật phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi

trường hiện nay còn có độ nhạy thấp, dẫn đến đánh giá chưa chính xác vùng dịch tễ của loài vi khuẩn này. Vì vậy, nội dung nghiên cứu thứ hai của luận án là phát triển kỹ thuật phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* có độ nhạy cao hơn các kỹ thuật hiện có và phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất còn hạn chế của nhiều phòng xét nghiệm tại Việt Nam.

## 1.5. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN

### 1.5.1. Cách tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis

Melioidosis được biết đến là bệnh nhiễm trùng nguy hiểm có các biểu hiện lâm sàng rất đa dạng, dẫn đến dễ bị chẩn đoán thành bệnh khác hoặc bị bỏ sót ca bệnh (Currie et al., 2000; Cheng et al., 2005). Cho đến nay, chẩn đoán melioidosis còn gặp nhiều thách thức, nguyên nhân chủ yếu do triệu chứng bệnh không điển hình và hiệu quả của các xét nghiệm thường quy còn nhiều hạn chế ( Meumann et al., 2012; Lau et al., 2015; Hoffmaster et al., 2013; Wiersinga et al., 2018). Xét nghiệm nuôi cấy vi sinh vi khuẩn *B. pseudomallei* được xem là “tiêu chuẩn vàng” trong chẩn đoán melioidosis nhưng độ nhạy thấp (dưới 60%) và thời gian xét nghiệm kéo dài không đáp ứng được tình trạng cấp tính của bệnh (Limmathurotsakul et al., 2010). Trong khi đó các que test nhanh phát hiện kháng nguyên *B. pseudomallei* có độ nhạy còn hạn chế, đặc biệt với mẫu bệnh phẩm máu và huyết thanh (Robertson et al., 2015; Woods et al., 2018; Rizzi et al., 2019). Bên cạnh đó, một số nhóm nghiên cứu đã phát triển que test nhanh phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng với độ nhạy và độ đặc hiệu tương đối khả quan nhưng cho đến hiện nay các sản phẩm này chưa được thương mại hóa ở nhiều quốc gia (Phokrai et al., 2018; Wagner et al., 2020). Các kỹ thuật phân tử như PCR, real-time PCR hoặc LAMP chưa được tiêu chuẩn hóa, độ nhạy và đặc hiệu còn thấp. Hơn nữa phòng xét nghiệm ở vùng dịch khó đáp ứng được yêu cầu của kỹ thuật phân tử do giá thành xét nghiệm cao, thiết bị hiện đại và kỹ thuật viên xét nghiệm có trình độ cao (Chantratita et al., 2007; Richardson et al., 2012; Hoffmaster et al., 2013; Wiersinga et al., 2018). Phương pháp huyết thanh học được

sử dụng phổ biến nhất trong chẩn đoán melioidosis là xét nghiệm ngưng kết hồng cầu gián tiếp IHA (Chua et al., 2005; Cheng et al., 2006a,b) có độ nhạy thấp dưới 56% và thường dương tính với người dân ở vùng dịch (Cheng et al., 2006; Harris et al., 2009; Chaichana et al., 2018). Hiện tượng này là do người dân ở vùng dịch thường xuyên tiếp xúc với vi khuẩn *B. pseudomallei* và các loài vi khuẩn môi trường thuộc chi *Burkholderia* nhưng không gây bệnh như loài *B. thailandensis* (Chantratita et al., 2007; Patpong et al., 2020). Trước những bất cập trong xét nghiệm melioidosis nói trên, việc phát triển được kỹ thuật xét nghiệm melioidosis thể cấp tính với độ nhạy và đặc hiệu cao là mục tiêu của nhiều nhà khoa học trên toàn thế giới.

Xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme ELISA là kỹ thuật xét nghiệm nhanh, có độ nhạy cao để đánh giá, phát hiện sự có mặt của một protein đặc hiệu (có thể là kháng nguyên hoặc kháng thể) trong mẫu cần phân tích. ELISA là một trong những kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch phổ biến trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu, trong chẩn đoán bệnh, trong kiểm soát chất lượng của nhiều ngành, lĩnh vực khác nhau. Trong nghiên cứu phát triển phương pháp xét nghiệm chẩn đoán melioidosis, ELISA đã được nhiều nghiên cứu tiếp cận (Chantratita et al., 2007; Hara et al., 2013; Chieng et al., 2015; Suttisunhakul et al., 2016; Kritsiriwuthinan et al., 2018). Một số kháng nguyên protein tái tổ hợp, kháng nguyên toàn tế bào và kháng nguyên polysaccharide đã được công bố trong nhiều nghiên cứu với độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Chantratita et al., 2007; Felgner et al., 2009; Chantratita et al., 2011; Kohler et al., 2016; Pumpuang et al., 2017).

Năm 2001, Woo và cs lần đầu tiên nghiên cứu nhân dòng gen *groEL* mã hóa cho protein gây kích thích miễn dịch của vi khuẩn *B. pseudomallei*. Đánh giá phản ứng miễn dịch của protein GroEL1 với các mẫu huyết thanh cho thấy GroEL1 phản ứng mạnh mẽ với huyết thanh bệnh nhân melioidosis mà không phản ứng chéo với mẫu huyết thanh nhiễm khuẩn khác hoặc huyết thanh của người khỏe mạnh. Kết quả này cho thấy GroEL1 có tiềm năng trong phát triển xét nghiệm chẩn đoán miễn dịch melioidosis (Woo et al., 2001). Vào năm 2009, protein GroEL1 được Felgner



và cs công bố là kháng nguyên có phản ứng với huyết thanh melioidosis cho tín hiệu mạnh nhất và thuộc nhóm 49 kháng nguyên đặc hiệu khi sàng lọc 1.205 kháng nguyên trên 747 mẫu huyết thanh của 10 nhóm bệnh nhân khác nhau đến từ vùng dịch melioidosis (Thái Lan, Singapo) hoặc không thuộc vùng dịch (Mỹ) (Felgner et al., 2009). Tiếp theo hướng nghiên cứu này, năm 2016 Kohler và cs đã sử dụng huyết thanh bệnh nhân nhiễm trùng melioidosis ở tuần 0, 12 và 52 để sàng lọc 20 kháng nguyên protein gây đáp ứng miễn dịch từ nghiên cứu của Felgner và cs (2009) và chọn 3 kháng nguyên có tín hiệu cao nhất là GroEL1 (BPSL2697); AhpC (BPSL2096) và GroEL2 (BPSS0477). Sau đó vào năm 2020, nhóm tác giả trên đã sử dụng 3 kháng nguyên trên kết hợp cùng kháng nguyên Hcp1 từ các nhóm nghiên cứu tại Thái Lan (Burtnick et al., 2011; Phokrai et al., 2018) để chế tạo que test nhanh Melioidosis DS phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* trong bệnh phẩm có độ nhạy 92%, đặc hiệu 98-100% (Wagner et al., 2020). Tuy nhiên, trong quá trình chế tạo que test, tác giả đánh giá kháng nguyên GroEL2 (BPSS0477) có tín hiệu phản ứng miễn dịch thấp nhất trong số 4 kháng nguyên được sử dụng (độ nhạy chỉ từ 1,3-2,7%) và dự kiến tìm kiếm kháng nguyên thay thế GroEL2 để cải thiện độ nhạy của que test.

Cùng thời điểm với các nghiên cứu trên, tại Thái Lan, Burtnick và cs (2011) đã nghiên cứu và công bố trong số 6 protein tiết, chỉ có Hcp1 (BPSL1498) tiết *in vivo* và gây đáp ứng miễn dịch tốt nhất được đánh giá bằng kỹ thuật western blot (Burtnick et al., 2011). Sau đó, bằng kỹ thuật ELISA, Hara và cs (2013) cũng công bố Hcp1 cho độ nhạy cao nhất trong số các kháng nguyên được nghiên cứu (Hara et al., 2013). Vào năm 2018, dựa trên các nghiên cứu trước của chính nhóm nghiên cứu (Pumpuang et al., 2017), Phokrai và cs đã sử dụng kháng nguyên Hcp1 để chế tạo que test nhanh melioidosis ICT phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* trong bệnh phẩm có độ nhạy khoảng 90% và độ đặc hiệu từ 88-100% tùy nhóm bệnh nhân (Phokrai et al., 2018).

Bên cạnh các kháng nguyên protein tái tổ hợp, kháng nguyên toàn tế bào whole cell (WC) với quy trình chuẩn bị đơn giản cũng là đối tượng tiềm năng và

được một số nghiên cứu sử dụng để phát triển kỹ thuật ELISA. Nghiên cứu đầu tiên về kháng nguyên toàn tế bào được Chantratita và cs (2007) công bố WC-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 81% và 70% (giá trị cut-off 0,482), cao hơn so với xét nghiệm ELISA sử dụng các kháng nguyên LPS và EPS tinh sạch. Nghiên cứu của Suttisunhakul và cs (2016) đã công bố độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm WC-ELISA trên 419 mẫu huyết thanh là 83 và 85.1%, giá trị cut-off là 0,36. Cùng thời điểm đó, tại Malaysia, Chieng và cs (2015) cũng công bố xét nghiệm WC-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu là 65,6% và 90% ở giá trị cut-off là 0,168.

Trên cơ sở tham khảo các công bố nói trên, nghiên cứu trong luận án này đã lựa chọn 3 kháng nguyên protein Hcp1 (BPSS1498); GroEL1 (BPSL2697) và AhpC (BPSL2096); và kháng nguyên toàn tế bào WC để phát triển kỹ thuật chẩn đoán miễn dịch ELISA. Chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157 có kiểu trình tự ST46 thường gặp ở Việt Nam được sử dụng làm nguồn kháng nguyên để phát triển kỹ thuật ELISA chẩn đoán nhanh melioidosis cho đối tượng người Việt. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học để phát triển que test nhanh, đáp ứng được nhu cầu sử dụng tại chỗ cho các bệnh viện tuyến nơi điều kiện cơ sở vật chất còn hạn chế.

### **1.5.2. Cách tiếp cận của nghiên cứu phát triển kỹ thuật phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường**

Nghiên cứu phát hiện một loài vi khuẩn nhất định từ mẫu đất bằng kỹ thuật nuôi cấy mà trong mỗi gram đất có thể chứa đến  $10^9$  CFU các vi khuẩn khác nhau là một thách thức lớn và có thể gặp phải nhiều khó khăn về phương pháp học, đặc biệt là những loài vi khuẩn tồn tại nhưng không thể nuôi cấy được (Bakken et al., 1987; Giagnoni et al., 2018). Vì vậy mà các kỹ thuật phân tử xác định trực tiếp vi khuẩn đã được áp dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu (Thompson et al., 2017), trong đó gồm cả việc xác định toàn bộ hệ vi sinh vật đất trong đất trồng lúa (Henckel et al., 1999; Knief et al., 2012; Lu Y et al., 2006). Nghiên cứu gần đây đã chứng minh kỹ thuật xét nghiệm trực tiếp không phụ thuộc nuôi cấy các mẫu môi trường bằng qPCR đa điểm có hiệu quả cao trong điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B.*

*pseudomallei* ngoài môi trường và có độ nhạy cao hơn đáng kể so với các kỹ thuật nuôi cấy hiện có (Gohler et al., 2017). Hơn nữa, nghiên cứu cũng chỉ ra mối tương quan giữa hàm lượng cao DNA đặc hiệu vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất với khả năng phân lập được loài vi khuẩn này bằng kỹ thuật nuôi cấy theo hướng dẫn chuẩn được khuyến nghị TBSS-C50 (Limmathurotsakul et al., 2013; Gohler et al., 2017). Hướng dẫn chuẩn trong nuôi cấy phân lập vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu môi trường (Limmathurotsakul et al., 2013) được xem là nỗ lực đầu tiên hết sức có ý nghĩa trong việc tiêu chuẩn hóa kỹ thuật nuôi cấy, mặc dù các thông số quan trọng như thời gian làm giàu, thành phần môi trường tối ưu, v.v... đã không được đánh giá trong các nghiên cứu riêng biệt. Trên thực tế, hướng dẫn chuẩn sử dụng môi trường TBSS-C50 cũng làm giàu các vi khuẩn non-*B. pseudomallei* đến nồng độ cao, đặc biệt là *B. thailandensis*, loài vi khuẩn có nhiều đặc điểm kiểu hình đặc biệt là hình dạng khuẩn lạc trên đĩa Ashdown giống với *B. pseudomallei* nhưng không gây bệnh (Smith et al., 1997; Kespichayawattana et al., 2004). Cả hai loài vi khuẩn này tồn tại cùng nhau trong môi trường tự nhiên dẫn đến kết quả nuôi cấy âm tính giả với *B. pseudomallei* do khả năng sinh trưởng mạnh mẽ của *B. thailandensis* (Hantrakun et al., 2018). Các nghiên cứu trước đây ở Thái Lan và Việt Nam đã chỉ ra rằng đa số các mẫu đất âm tính với *B. pseudomallei* bằng nuôi cấy đều nuôi cấy phân lập được *B. thailandensis* (Trakulsomboon et al., 2000; Ngamdee et al., 2015; Hantrakun et al., 2018). Mặc dù môi trường TBSS-C50 chứa kháng sinh giúp tăng cường tính chọn lọc đối với *B. pseudomallei* nhưng ngoài sự cạnh tranh với *B. thailandensis*, các vi khuẩn môi trường khác cũng có đặc điểm kháng tự nhiên với các nhóm kháng sinh sử dụng và do đó xảy ra sự cạnh tranh với *B. pseudomallei* trong dịch làm giàu cũng như trên đĩa thạch Ashdown (Wuthiekanun et al., 1995; Walsh et al., 2013).

Theo các công bố trước đây, các kỹ thuật phân tử xét nghiệm trực tiếp luôn phát hiện số mẫu dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei* cao hơn nhiều so với số mẫu dương tính với *B. pseudomallei* bằng phân lập trực tiếp trên đĩa thạch (Knappik

et al., 2015). Điều này chứng tỏ có tỉ lệ lớn mẫu nuôi cấy cho kết quả âm tính giả cần được quan tâm khắc phục do kỹ thuật phân tử phát hiện trực tiếp DNA của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất hoặc trong dịch nuôi cấy làm giàu chỉ là nhận định ban đầu về khu vực có nguy cơ ô nhiễm *B. pseudomallei* mà không phân lập được vi khuẩn phục vụ cho các nghiên cứu về độc lực, tính kháng kháng sinh cũng như các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử (Knappik et al., 2015; Gohler et al., 2017; Dance et al., 2018). Hơn nữa, so với kỹ thuật phân tử thì kỹ thuật nuôi cấy sẽ dễ dàng được áp dụng ở những vùng dịch tễ melioidosis nơi có điều kiện phòng xét nghiệm còn hạn chế.

Năm 1992, Yabuuchi và cs đã công bố về các đặc điểm trao đổi chất của các loài thuộc chi *Burkholderia*, loài vi khuẩn *B. pseudomallei* có thể đồng hóa erythritol trong khi đó các loài *Burkholderia* spp. còn lại, đặc biệt là *B. thailandensis*, không có khả năng sử dụng nguồn đường này (Yabuuchi et al., 1992). Dựa trên khả năng sử dụng erythritol của loài vi khuẩn *B. pseudomallei* mà đường như không phổ biến ở các loài *Burkholderia* spp. khác (Yabuuchi et al., 1992), nghiên cứu của luận án đã thiết kế môi trường mới EM chứa colistin để phân lập *B. pseudomallei* từ mẫu đất sử dụng erythritol là nguồn carbon duy nhất. Như vậy, tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy mới EM không chỉ được quyết định bởi kháng sinh mà còn bởi nguồn carbon đặc biệt erythritol.

Trong nghiên cứu này, quy trình làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu đất sử dụng môi trường mới EM và môi trường theo hướng dẫn chuẩn TBSS-C50 được so sánh, đánh giá qua kỹ thuật làm giàu một bước (48 giờ và 144 giờ) và làm giàu hai bước (bước 1 trong 48 giờ và bước 2 trong 96 giờ). Tổng số 640 dịch nuôi cấy làm giàu của 80 mẫu đất trên hai loại môi trường (TBSS-C50 và EM) sử dụng hai quy trình nuôi cấy (làm giàu một bước và hai bước) đã được phân tích bằng real-time PCR TTSS1 và nuôi cấy trên đĩa thạch Ashdown để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy mới.

## CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

#### 2.1.1. Hóa chất và thiết bị

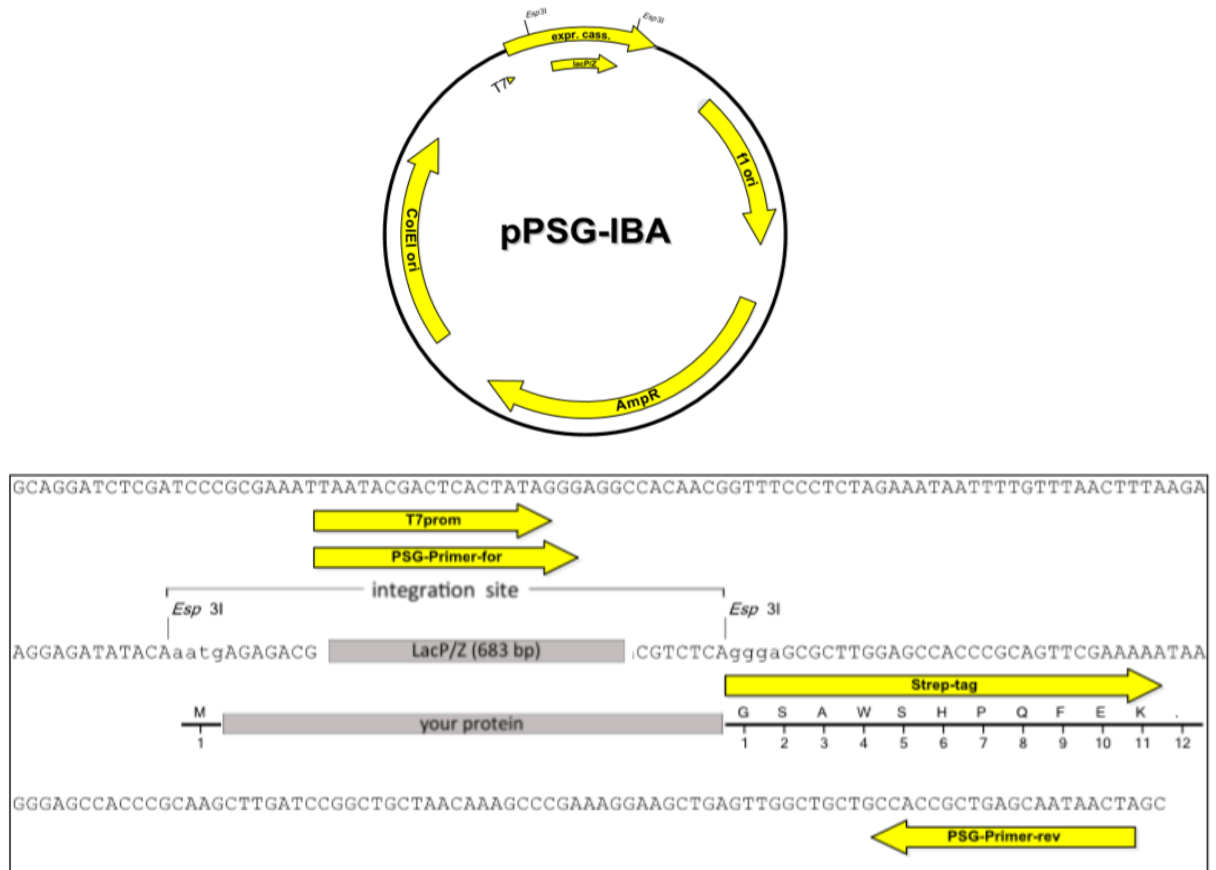
##### 2.1.1.1. Hóa chất

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu của luận án được mua từ nhà sản xuất uy tín, đảm bảo độ đáng tin cậy của thí nghiệm (Bảng 2.1).

**Bảng 2.1.** Danh mục hóa chất dùng trong nghiên cứu của luận án

Tên hóa chất	Xuất xứ
Mueller Hinton agar (MHA), Luria-Bertani (LB) broth, trypticase soy agar	Becton, Dickinson and Company (Mỹ)
KOH, L-threonine, erythritol, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, NaCl, nitrilotriacetic, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , isopropyl β-D-thiogalactopyranoside solution (IPTG), ampicillin và H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Merck (Đức)
Crystal violet, neutral red, polyacrylamide, O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD)	Sigma (Mỹ)
Glycerol, chloroform, isoamylalcohol, phusion high-fidelity DNA polymerase, kit GeneJET PCR purification, isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside, protein pageRuler™ unstained protein ladder 10- 200 ka, methanol, acetic acid, polyvinylidene difluoride, Pierce™ 1-Step Ultra TMB, Tris-HCl, Na <sub>2</sub> EDTA, NaCl, cetyltrimethyl ammonium bromide, lysozyme, protease K, sodium dimethyl sulfate (SDS), isopropanol, qPCR Mastermix 2X, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal), enzyme giới hạn <i>Esp3I</i> , và màng polyvinylidene difluoride (PVDF)	ThermoFisher Scientific (Mỹ)
Kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase	Abcam (Mỹ)
Môi real-time PCR BpTT4176F, BpTT4290R và đầu dò BpTT4208P Bộ môi khuếch đại 7 house-keeping gene cho phân tích MLST Bộ môi khuếch đại các gen mã hóa protein kháng nguyên	IDT (Mỹ)
Agarose, bovine serum albumin (BSA), coomassie brilliant blue và tween	Bio Basic (Canada)
Vector pPSG-IBA3 và bộ kit tinh sạch protein Strep-tactin XT	IBA (Đức)
Gentamicin	Vidipha (Việt Nam)
Colistimethate natri	Polfa-tarchomin (Ba Lan)

- Cấu trúc của vector pPSG-IBA3 dùng cho nhân dòng và biểu hiện gen mã hóa protein kháng nguyên:



**Hình 2.1.** Cấu trúc vector pPSG-IBA3 (Nguồn: IBA)

Vector pPSG-IBA3 có kích thước 3.496 bp, sử dụng promoter T7, một promoter mạnh được kiểm soát chặt chẽ, đảm bảo protein tái tổ hợp được tổng hợp chỉ khi có mặt chất cảm ứng IPTG. Tại đầu C của vector có trình tự mã hóa cho 11 protein của đuôi Strep-tag giúp protein đích tạo ra dễ dàng được tinh sạch bằng sắc ký ái lực. Vector có hai vị trí cắt của enzyme giới hạn *Esp3I* [CGTCTC(N1/N5)]. Vector được thiết kế sao cho gen đích được gắn vào vector gốc tại hai vị trí cắt enzyme *Esp3I*. Vector mang gen *ampR* nên dễ dàng chọn lọc dòng vi khuẩn mang vector trên môi trường có chứa kháng sinh ampicillin. Vector mang gen *lacZ*, mã hóa cho tiểu phần  $\alpha$  của  $\beta$ -galactosidase, nằm ở giữa hai vị trí cắt của enzyme giới hạn *Esp3I*, giúp chọn lọc những khuẩn lạc có gen chèn dựa trên sự chọn lọc màu sắc trắng/ xanh của khuẩn lạc.

### 2.1.1.2. Thiết bị

Thiết bị được sử dụng cho nghiên cứu của luận án là gồm các thiết bị sử dụng cho nuôi cấy vi sinh và cho các thí nghiệm sinh học phân tử, miễn dịch thuộc Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học (Viện VSV&CNSH) (Bảng 2.2).

**Bảng 2.2.** Danh mục các thiết bị dùng trong nghiên cứu của luận án

Tên thiết bị	Xuất xứ
Tủ cấy an toàn sinh học cấp II	Nuaire, Mỹ
Nồi hấp vô trùng 110 L	Hirayama, Nhật
Tủ ấm	Eyela, Nhật
Máy lắc ổn nhiệt	Amerex, Mỹ
Máy định lượng DNA NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific, Mỹ
Máy PCR Biometra Trio, máy soi gel DNA	Analytik Jena, Đức
Máy điện di DNA, máy điện di protein, máy chuyển màng SD10, máy blotting	Cleaver Scientific, Anh
Máy đọc đĩa ELISA 800 TS Microplate Reader, máy rửa đĩa ELISA 500 TS	BioTek, Mỹ
Máy PCR Mastercycler ep realplex real-time PCR system	Agilent, Mỹ
Máy ly tâm, máy ủ nhiệt có rung lắc	Eppendorf, Mỹ
Cân điện tử 3 số và 4 số	Sartorius, Đức
Máy đo pH	Horiba, Nhật

### 2.1.2. Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* NA23 được sử dụng để chuẩn bị kháng nguyên toàn tế bào và kháng nguyên protein tái tổ hợp. Chủng được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (VTCC), Viện VSV&CNSH với mã số VTCC 70157. Chủng VTCC 70157 được phân lập từ bệnh nhân nam 49 tuổi, có biểu hiện nhiễm khuẩn huyết kèm viêm phổi tại BVĐK tỉnh Nghệ An năm 2015. Trình tự kiểu gen của chủng VTCC 70157 được xác định ST 46 và được đăng ký trên cơ sở dữ liệu MLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). ST 46 là kiểu trình tự gen thường gặp trong lâm sàng và ngoài môi trường Việt Nam (Phuong & Trung et al., 2008; Trung et al., 2019).

Dòng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific) có khả năng biến nạp plasmid cao và dễ dàng với số lượng bản sao lớn và ổn định. Dòng vi khuẩn chứa plasmid mang gen được sàng lọc bằng các phương pháp sàng lọc khuẩn lạc trắng xanh trên môi trường chứa X-gal.

Dòng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Thermo Scientific) cho phép biểu hiện protein tái tổ hợp hiệu suất cao dưới sự kiểm soát của promoter T7.

### 2.1.3. Mẫu huyết thanh

#### 2.1.3.1. Mẫu huyết thanh cho phát triển kỹ thuật xét nghiệm melioidosis

185 mẫu huyết thanh được thu tại 4 BVĐK các tỉnh: Bắc Giang (n=13), Nghệ An (n=76), Hà Tĩnh (n=13) và Bình Định (n=83) trong khoảng thời gian từ tháng 1/2018-12/2020. Mẫu huyết thanh được thu bằng ống không chứa chất chống đông và được chia thành 3 nhóm: (1) nhóm dương tính với melioidosis được khẳng định bằng xét nghiệm nuôi cấy (n=63, tuổi từ 8-76, tỉ lệ nam/nữ =2,3); (2) nhóm dương tính với nhiễm khuẩn khác được khẳng định bằng xét nghiệm nuôi cấy (n=62, tuổi từ 15-96, tỉ lệ nam/nữ =2,3) và (3) nhóm khỏe mạnh (n=60, tuổi từ 18-86, tỉ lệ nam/nữ =2,0) (Bảng 2.3).

**Bảng 2.3.** Bộ 185 mẫu huyết thanh thu tại BVĐK Bắc Giang, Nghệ An, Hà Tĩnh, Bình Định phát triển kỹ thuật xét nghiệm melioidosis

STT	Loại mẫu huyết thanh	Số lượng	Tỉ lệ nam/nữ	Độ tuổi
1	Dương tính với melioidosis	63	2,3	8-76
2	Nhiễm khuẩn khác	62	2,3	15-96
3	Khỏe mạnh	60	2,0	18-86

Với nhóm nhiễm trùng melioidosis, huyết thanh được thu khi có kết quả xét nghiệm nuôi cấy tại thời điểm 3-10 ngày sau khi nhập viện. Ở nhóm nhiễm khuẩn khác, bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm các loài vi khuẩn *Acinetobacter* spp. (n=2), *Enterococcus* spp. (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Escherichia coli* (n=28), *Klebsiella pneumoniae* (n=10), *Pseudomonas* spp. (n=4), *Salmonella* spp. (n=1), *Staphylococcus aureus* (n=8), và *Streptococcus* spp. (n=6). Các loài vi khuẩn trên được định danh bằng các hệ thống định danh tự động như Phoenix 100 (Becton, and Dickinson and Company, USA) hoặc Vitek 2 Compact (Biomerieux, France). Ở



nhóm khỏe mạnh, huyết thanh được thu từ bệnh nhân khám sức khỏe định kỳ tại các bệnh viện.

Do mẫu chuẩn huyết thanh melioidosis không lưu hành thương mại, nên luận án đã sử dụng bộ huyết thanh melioidosis thu thập đa dạng từ các bệnh viện tại các khu vực khác nhau để phát triển kỹ thuật ELISA. Toàn bộ các mẫu huyết thanh được xác định là nhiễm trùng melioidosis bằng xét nghiệm nuôi cấy phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* - là “tiêu chuẩn vàng” trong chuẩn đoán melioidosis.

#### *2.1.3.2. Mẫu huyết thanh cho đánh giá kỹ thuật xét nghiệm melioidosis*

Một bộ huyết thanh khác gồm 1.011 mẫu được thu vào tháng 10-11/2020 tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511) và BV TƯ Huế (n=500). Huyết thanh được thu tại thời điểm ngày thứ 1 đến 5 sau khi bệnh nhân nhập viện với các biểu hiện nghi ngờ nhiễm melioidosis như sốt kéo dài nhưng chưa rõ căn nguyên; sốt kéo dài kèm theo một số dấu hiệu viêm phổi; đau tức ở các vùng nội tạng; viêm tấy cơ xương khớp; có thể bị chẩn đoán nhầm thành u phổi, u gan, u lách, u tiền liệt tuyến; có các yếu tố nguy cơ nhiễm melioidosis như tiểu đường, nghiện rượu, dùng corticoid lâu ngày, suy gan thận, có tiếp xúc với đất, nước, đến từ vùng lũ và vùng dịch tễ melioidosis.

Tất cả các mẫu huyết thanh được gửi về Viện VSV&CNSH trong hộp bảo quản lạnh chứa đá gel và sau đó được bảo quản tại -70°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### *2.1.3.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu*

Nội dung nghiên cứu của luận án liên quan đến thu thập và sử dụng mẫu bệnh phẩm, thông tin bệnh nhân đã được Hội đồng Y đức, trường Đại học Y Dược, ĐHQGHN thông qua tại Giấy chấp thuận số 04/2020/CN-HĐĐĐ ngày 20/5/2020.

### **2.1.4. Mẫu môi trường**

#### *2.1.4.1. Mẫu đất dùng cho phát triển kỹ thuật nuôi cấy*

Vào tháng 6-7/2018, có 80 mẫu đất được lấy tại 16 điểm, trong đó 9 điểm ở các tỉnh Bắc Trung Bộ (nơi được báo cáo có nhiều ca nhiễm melioidosis), gồm Thanh Hóa (n=3), Hà Tĩnh (n=6); và 7 điểm ở các tỉnh Nam Trung Bộ (nơi chưa có ca melioidosis nào được ghi nhận trước đó), gồm Quảng Ngãi (n=2), Bình Định (n=3), Phú Yên (n=1) và Khánh Hòa (n=1) (Bảng 2.4). Các điểm lấy mẫu

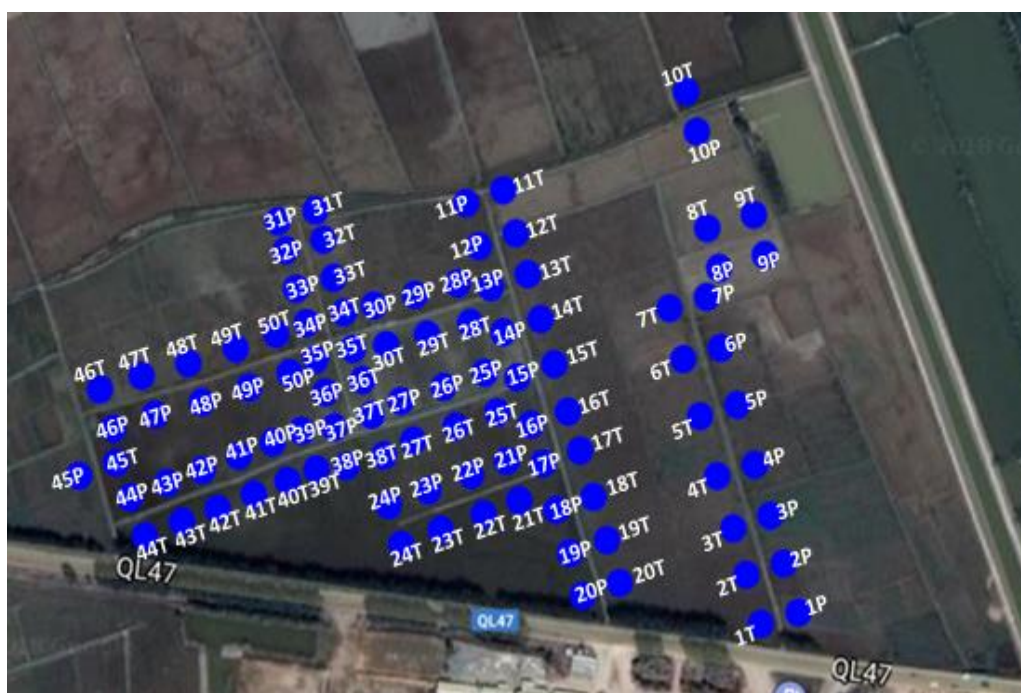
nằm trong ruộng lúa và được lựa chọn dựa trên kết quả điều tra phân bố của *B. pseudomallei* ngoài môi trường năm 2015-2016 (Đề tài RENOMAB, 2014-2017, PGS. TS. Đoàn Mai Phương và TS. Trịnh Thành Trung).

Tại mỗi điểm, 5 mẫu đất được lấy tại 5 vị trí ở độ sâu 30 cm bằng dụng cụ khoan đất chuyên dụng. Khoảng cách giữa các vị trí lấy mẫu đất từ 10-20 m. Sau mỗi lần lấy mẫu, đầu khoan được rửa sạch bằng nước uống đóng chai và khử trùng bằng cồn 70%. Khoảng 200 g đất được bảo quản riêng biệt trong túi zip, đặt trong hộp xốp và chuyển ngay về Viện VSV&CNSH.

**Bảng 2.4.** Thông tin của 80 mẫu đất dùng cho nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy

Khu vực	Tỉnh	Số điểm	Số mẫu	Ghi chú
Bắc Trung Bộ	Thanh Hóa	3	15	Đã từng phân lập được vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> /Đã ghi nhận ca nhiễm melioidosis
	Hà Tĩnh	6	30	
Nam Trung Bộ	Quảng Nam	2	10	Chưa từng phân lập được vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> /Chưa ghi nhận ca nhiễm
	Bình Định	3	15	
	Phú Yên	1	5	
	Khánh Hòa	1	5	

#### 2.1.4.2. Mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn - Thanh Hóa



**Hình 2.2.** Vị trí thu mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn - Thanh Hóa

Năm 2019, 800 mẫu nước ruộng lúa đã được thu tại 100 vị trí khác nhau (mỗi vị trí cách nhau 2,5 m) vào 8 thời điểm trong thời gian canh tác lúa (27/2; 10/4; 9/5; 23/5; 11/6; 16/7; 15/8 và 20/9) tại xã Dân Lực, huyện Triệu Sơn, tỉnh Thanh Hóa (Hình 2.2). Để tránh nhầm lẫn, vị trí thu mẫu được đánh dấu bằng cọc tre theo thứ tự từ 1-50 T và 1-50 P. Tại mỗi vị trí, 300 mL nước ruộng được lấy vào chai nước uống đóng chai sạch (loại bỏ nước có sẵn trong chai ngay trước khi thu mẫu). Mẫu nước được vận chuyển về Viện VSV&CNSH ngay trong ngày.

#### 2.1.4.3. Mẫu đất và nước tại Sóc Sơn - Hà Nội

Mẫu đất và nước trong khu vực gia đình có 3 trẻ em tử vong do melioidosis và khu vực xung quanh (thôn Đô Lương, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn) được thu vào 2 đợt.

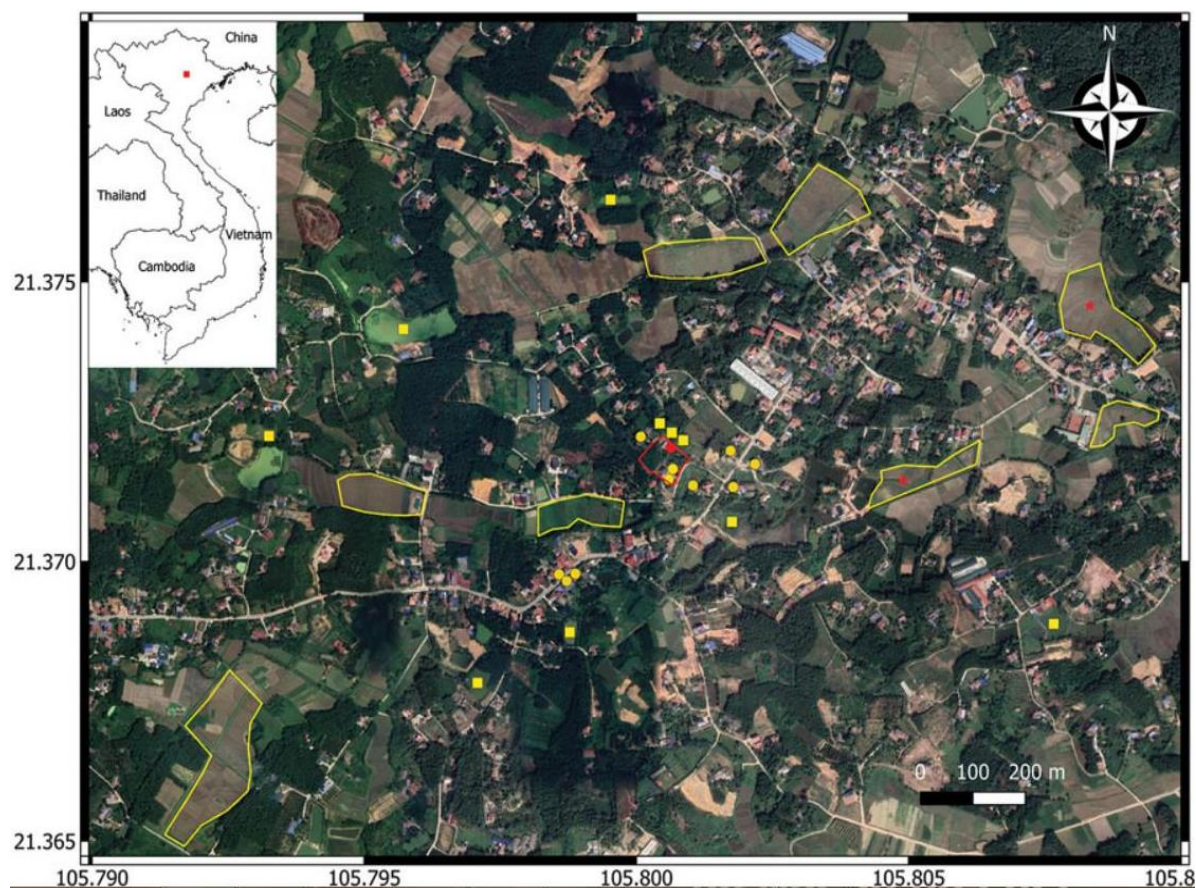
**Bảng 2.5.** Thông tin mẫu đất và nước thu tại gia đình nạn nhân và khu vực xung quanh

Loại mẫu	Số lượng mẫu	Số vị trí	Ghi chú
<b>Thu mẫu lần 1 (17/11/2019)</b>			
Đất vườn trước nhà	7	7	Độ sâu 10 cm, 100 g/mẫu
Nước giếng A (téc nước)	3	1	300 mL/mẫu
Nước giếng B	3	1	300 mL/mẫu
Nước giếng C	3	1	300 mL/mẫu
Nước uống	1	1	300 mL/mẫu
<b>Thu mẫu lần 2 (23/11/2019)</b>			
Đất vườn sau nhà (xung quanh giếng A)	46	10	Độ sâu 10-50 cm, 100 g/mẫu
Đất ruộng	40	8	Độ sâu 30 cm
Nước giếng A	26	1	Từ phút 0-240, 5 phút/1 lần thu mẫu với phút 0-120 và 1 mẫu ở phút 240
Nước giếng B	3	1	300 mL/mẫu
Nước giếng C	3	1	300 mL/mẫu
Nước giếng hàng xóm	33	11	300 mL/mẫu
Nước ao	30	10	300 mL/mẫu
<b>Tổng số</b>	<b>198</b>	<b>53</b>	

Đợt 1 (17/11/2019): thu 7 mẫu đất vườn ở độ sâu 10 cm, 9 mẫu nước giếng từ 3 giếng (giếng tắm A, giếng chăn nuôi B và giếng ăn C) và 1 mẫu nước uống của

gia đình nạn nhân. Do tính chất khẩn cấp của nghiên cứu nên việc lấy mẫu được tiến hành ngay trong đêm nhận được thông tin về ca bệnh melioidosis, dẫn đến việc dụng cụ khoan đất chuyên dụng không được chuẩn bị kịp thời (dụng cụ khoan đất được mượn từ đơn vị nghiên cứu khác), vì vậy, ở đợt lấy mẫu đầu tiên, mẫu đất chỉ được thu ở độ sâu 10 cm.

Đợt 2 (23/11/2019): thu 46 mẫu đất vườn tại 10 vị trí quanh giếng A ở các độ sâu khác nhau (10-50 cm); 40 mẫu đất ruộng tại 8 ruộng lúa ở độ sâu 30 cm; 26 mẫu nước giếng từ giếng A sau mỗi 5 phút bơm từ phút 0 đến 240; 39 mẫu nước giếng từ giếng B, C và 11 giếng của các hộ hàng xóm; 30 mẫu nước ao từ 10 ao xung quanh khu đất nhà nạn nhân. Thông tin chi tiết được trình bày ở Bảng 2.5 và Hình 2.3.



**Hình 2.3.** Vị trí thu mẫu đất và nước tại Sóc Sơn. Đường viền màu đỏ là khu đất của gia đình nạn nhân (chấm tròn đỏ-giếng A, chấm tròn vàng-giếng B, C). Đường viền màu vàng là các ruộng lúa được lấy mẫu đất. Hình tròn màu vàng-giếng của hộ hàng xóm, hình vuông màu vàng-ao

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis

#### 2.2.1.1. Chuẩn bị kháng nguyên toàn tế bào

Để chuẩn bị kháng nguyên toàn tế bào (whole cell-WC), chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157 được nuôi cấy trên môi trường MHA ở 37°C trong 24 giờ (Chantratita et al., 2007; Suttisunhakul et al., 2016). Sau đó, tế bào vi khuẩn được thu bằng cách sử dụng tấm bông vô trùng gạt khuẩn lạc hòa vào nước Milli-Q để được dịch huyền phù có OD<sub>600</sub>=1. Dịch huyền phù được xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút để giết chết vi khuẩn. Sau khi xử lý nhiệt, dịch huyền phù được cấy ria kiểm tra trên môi trường MHA để đảm bảo tất cả các tế bào vi khuẩn đã bị giết chết trước khi được sử dụng làm kháng nguyên.

#### 2.2.1.2. Chuẩn bị kháng nguyên protein tái tổ hợp

##### Tạo dòng và biểu hiện protein kháng nguyên

DNA của chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 được tách chiết sử dụng chloroform: isoamyl alcohol. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được kiểm tra trên máy NanoDrop 2000. PCR khuếch đại các gen *BPSS1498*, *BPSL2697* và *BPSL2096* mã hóa các protein Hcp1, GroEL1 và AhpC được thực hiện với tổng thể tích phản ứng là 25  $\mu$ L sử dụng Phusion High-Fidelity DNA Polymerase và cặp mồi đặc hiệu đã được mô tả trong nghiên cứu của Burtnick và cs (2011), Kohler và cs (2016) và được thiết kế phù hợp với trình tự nhận biết của enzyme giới hạn Esp3I là CGTCTC(N1/N5) sử dụng công cụ thiết kế Eurofins (Bảng 2.6). Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy PCR Biometra Trio với điều kiện phản ứng là 95°C trong 30 giây; 35 chu kỳ (95°C trong 10 giây; 61°C trong 30 giây; 72°C trong 45 giây); 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR có kích thước theo dự đoán 507 bp, 1.638 bp và 546 bp tương ứng với các gen *BPSS1498*, *BPSL2697* và *BPSL2096* được kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit GeneJET PCR purification theo hướng dẫn của nhà sản xuất trước khi đưa vào vector pPSG-IBA3 và nhân dòng trên chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ .

**Bảng 2.6.** Thông tin về các cặp môi của 3 gen mã hóa kháng nguyên protein

TT	Ký hiệu gen	Kích thước gen (bp)	Trình tự môi xuôi và vị trí cắt của enzyme Esp3I	Trình tự môi ngược và vị trí cắt của enzyme Esp3I
1	<i>BPSS1498</i>	507	AGCGCGTCTCCAATGCT GGCCGGAATATA	AGCGCGTCTCCTCCC GCATTCGTCCAGTTT GCG
2	<i>BPSL2697</i>	1.638	AGCGCGTCTCCAATGGC AGCTAAAGACGTCGTAT TCGG	AGCGCGTCTCCTCCCCA TGTCCATGCCCATGCCG CC
3	<i>BPSL2096</i>	546	AGCGCGTCTCCAATGAA GACCGTGGGCGATAA	AGCGCGTCTCCTCCCCA GCGTCGCGCCGCCGATC

Plasmid pPSG-IBA3:BPSS1498; pPSG-IBA3:BPSL2697; pPSG-IBA3:BPSL 2096 được tách chiết từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5 $\alpha$  trắng trên thạch LB chứa X-gal 20 mg/mL trước khi biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Các dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được nuôi cấy trên 20 mL môi trường LB lỏng chứa ampicillin 100  $\mu$ g/mL và 10  $\mu$ L IPTG 1 M để biểu hiện các protein Hcp1, GroEL1 và AhpC. Sau 4 giờ nuôi cấy ở 37°C, 160 vòng/phút, tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm 8.000 vòng/phút trong 5 phút và được lưu giữ ở -20°C cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

#### Tinh sạch protein kháng nguyên

Tế bào vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp được hòa vào đệm W (Tris/HCl 100 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; IBA, Đức) chứa urea 6 M, ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, sau đó ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 30 phút. Phần dịch huyền phù được tải lên cột Strep-tactin XT. Quy trình rửa và thu hồi protein kháng nguyên tái tổ hợp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein tái tổ hợp được tinh sạch và định lượng bằng phương pháp Bradford sử dụng chất chuẩn bovine serum albumin (BSA) với dãy pha loãng 10-80  $\mu$ g/mL trong đệm phosphate-buffered saline (PBS). Dung dịch Bradford được chuẩn bị dung dịch có thành phần gồm: coomassie brilliant blue G-250 100 mg; ethanol 95% 50 mL; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% 100 mL và nước cất đủ 1 L. Dựa trên mối tương quan giữa nồng độ BSA ( $\mu$ g/mL) và giá trị OD<sub>595</sub> để xây dựng đường chuẩn dạng:  $y = ax + b$ , trong đó x là nồng độ BSA ( $\mu$ g/mL), y là giá trị OD<sub>595</sub>.

### Kỹ thuật SDS-PAGE

Các phân đoạn tải mẫu, rửa cột và thu hồi protein tái tổ hợp trên cột Strep-tactin XT, cùng thang chuẩn protein PageRuler™ Unstained Protein Ladder 10 to 200 kDa được điện di trên gel SDS-PAGE (kích thước 8x8,5 cm) với polyacrylamide 15%, 120 V trong 2 giờ. Bản gel sau khi điện di được nhuộm với coomassie brilliant blue 0,1% trong 30 phút, và được tẩy bằng dung dịch tẩy màu (methanol 40% và acetic acid 10%) trong 45 phút và dịch tẩy màu được thay sau mỗi 15 phút (Burtnick and Brett, 2013).

### Kỹ thuật Western Blot

Protein trên gel SDS-PAGE sau điện di được chuyển lên màng polyvinylidene difluoride (PVDF) bằng máy chuyển màng, 30 V trong 1 giờ. Màng PVDF sau đó được ngâm với đệm PBS chứa 5% BSA và 0,05% tween 20, rửa 3 lần với đệm PBS và ủ với kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10.000). Sau khi rửa với đệm PBS, màng được ủ với dung dịch cơ chất TMB đến khi xuất hiện màu phản ứng (Burtnick and Brett, 2013).

#### *2.2.1.3. Kỹ thuật ELISA cho xét nghiệm nhanh melioidosis*

Kỹ thuật ELISA được thực hiện theo mô tả của Pumpuang và cs (2017). Nồng độ tối ưu của kháng nguyên protein tái tổ hợp gắn lên đĩa ELISA được xác định trên bộ mẫu huyết thanh của bệnh nhân nhiễm melioidosis đã khẳng định bằng nuôi cấy (n=5) và người khỏe mạnh (n=5). Kháng nguyên protein được pha loãng trong đệm PBS để đạt nồng độ từ 0,05-3,0 µg/mL trước khi gắn lên đĩa ELISA.

Các đĩa ELISA (loại 96 giếng, đáy phẳng, Corning, Mỹ) được chuẩn bị bằng cách phủ 100 µL kháng nguyên WC hoặc 50 µL mỗi loại kháng nguyên protein tái tổ hợp và ủ 4°C qua đêm. Protein dư thừa được loại bỏ và rửa 3 lần với đệm PBS chứa 0,05% tween 20. Sau khi ủ với đệm PBS chứa 1% BSA, huyết thanh thử nghiệm (đã pha loãng với đệm PBS ở tỷ lệ 1:4.000) được tra vào các giếng ELISA. Sau khi rửa đĩa 3 lần, mỗi giếng được bổ sung 100 µL kháng thể dê kháng kháng thể người IgG cộng hợp horseradish peroxidase (pha loãng trong đệm PBS 1:10.000) và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi đổ bỏ dịch dư thừa và rửa đĩa 3 lần, các giếng được bổ sung 100 µL dung dịch cơ chất OPD [(100 mL dung dịch O-

phenylenediamine dihydrochloride 0,016% chứa 16  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30%), ủ 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó 50  $\mu\text{L}$  dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M được bổ sung vào các giếng để dừng phản ứng và đo cường độ màu tạo thành ở bước sóng 490 nm trên máy 800 TS Microplate Reader. Thí nghiệm được lặp lại hai lần đối với mỗi mẫu huyết thanh. Đối chứng dương là mẫu huyết thanh thu từ các bệnh nhân dương tính với melioidosis đã khẳng định bằng nuôi cấy; đối chứng âm là mẫu huyết thanh thu từ người khỏe mạnh.

Độ pha loãng huyết thanh 1:4.000 được sử dụng trong toàn bộ luận án căn cứ vào thí nghiệm đánh giá hệ số pha loãng huyết thanh 1:500-1:1.024.000. Giá trị huyết thanh pha loãng (serum titer) được xác định dựa vào giá trị cut-off của xét nghiệm ELISA đảm bảo độ đặc hiệu của xét nghiệm  $\geq 95\%$ . Từ đó, giá trị pha loãng huyết thanh của mỗi mẫu dương tính được xác định bằng giá trị pha loãng tối thiểu tương ứng với giá trị đọc OD490 nm lớn hơn hoặc bằng giá trị cut-off. Tương tự, giá trị pha loãng của mỗi mẫu âm tính được xác định bằng giá trị pha loãng tối thiểu tương ứng với giá trị đọc OD490 nm nhỏ hơn giá trị cut-off (Phụ lục 12, 13).

### 2.2.2. Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu phát hiện *B. pseudomallei* ngoài môi trường

#### 2.2.2.1. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

- Thành phần môi trường làm giàu TBSS-C50 (Threonine-basal salt solution containing colistin) được trình bày ở Bảng 2.7.

**Bảng 2.7.** Thành phần môi trường TBSS-C50 cơ bản (Galimand and Dodin, 1982)

Thành phần	Khối lượng/thể tích
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,45 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,73 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,12 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
NaCl	10 g
Nitritotriacetic	0,2 g
Dung dịch muối khoáng	20 mL
Nước cất vừa đủ	900 mL



Môi trường sau khi pha được chỉnh đến pH 7,2 bằng dung dịch KOH 1N, khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau đó, 5,96 g L-threonine được pha trong 100 mL nước cất và lọc vô trùng trước khi bổ sung vào dung dịch TBSS-C50 cơ bản. Cuối cùng, 1 triệu đơn vị colistimethate natri được hòa tan trong 2 mL nước cất và bổ sung vào môi trường cơ bản để được môi trường làm giàu TBSS-C50 chứa 50 mg/L colistin (Limmathurotsakul et al., 2013)

- Thành phần dung dịch muối khoáng được trình bày ở Bảng 2.8.

**Bảng 2.8.** Thành phần dung dịch khoáng (Galimand and Dodin, 1982)

<b>Thành phần</b>	<b>Khối lượng/thể tích</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	2,31 mL
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,56 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,30 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,02 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,13 g
Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O	0,03 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06 g
Nước cất vừa đủ	1.000 mL

Dung dịch muối khoáng được khử trùng 121°C trong 20 phút.

- Thành phần môi trường làm giàu EM (Erythritol medium) được trình bày ở Bảng 2.9.

**Bảng 2.9.** Thành phần môi trường làm giàu EM cơ bản

<b>Thành phần</b>	<b>Khối lượng/thể tích</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,73 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaCl	10 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,15 g
Dung dịch muối khoáng	20 mL
Nước cất vừa đủ	900 mL

Môi trường sau khi pha được chỉnh đến pH 7,2 bằng dung dịch KOH 1N, khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau đó, 5,96 g erythritol được hòa tan trong 100 mL nước cất và lọc vô trùng trước khi bổ sung vào môi trường EM cơ bản. Cuối cùng, 1 triệu đơn vị colistimethate natri được hòa tan trong 2 mL nước cất và bổ sung vào môi trường EM cơ bản để được môi trường làm giàu EM chứa 50 mg/L colistin.

- Thành phần môi trường thạch Ashdown được trình bày ở Bảng 2.10.

**Bảng 2.10.** Môi trường thạch Ashdown (Ashdown, 1979a)

Thành phần	Khối lượng/thể tích
Trypticase soy agar	10 g
Glycerol	40 mL
Crystal violet	5 mg
Neutral red	50 mg
Nước cất vừa đủ	1000 mL

Môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi môi trường hạ nhiệt độ xuống khoảng 60°C, 5 mg gentamicin được hòa tan vào trong 2 mL nước cất và bổ sung vào môi trường Ashdown trước khi đổ đĩa.

2.2.2.2. *Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu phát hiện B. pseudomallei ngoài môi trường*

Mẫu đất (khoảng 100 - 200 g) được đồng nhất trước khi thực hiện các thí nghiệm phân tích so sánh các kỹ thuật nuôi cấy khác nhau. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tại Hình 2.4.

*Nuôi cấy làm giàu bước 1:*

- Cân 20 g đất vào bình tam giác 100 mL, bổ sung 20 mL nước đã khử trùng, và lắc ở 160 vòng/phút trong 1 giờ.

- Huyền dịch đất được chia thành hai phần bằng nhau vào hai ống falcon 50 mL.

- Sau đó, 10 mL một trong hai loại môi trường EM hoặc TBSS-C50 với nồng độ gấp đôi (2X) được bổ sung vào mỗi ống huyền dịch đất.

- Đóng nhẹ nắp ống và ủ ở 40°C, trong 48 giờ.

- Ống được vortex đều trong 10 giây và để lắng 1 giờ. Đây được coi là dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ và EM 48 giờ.

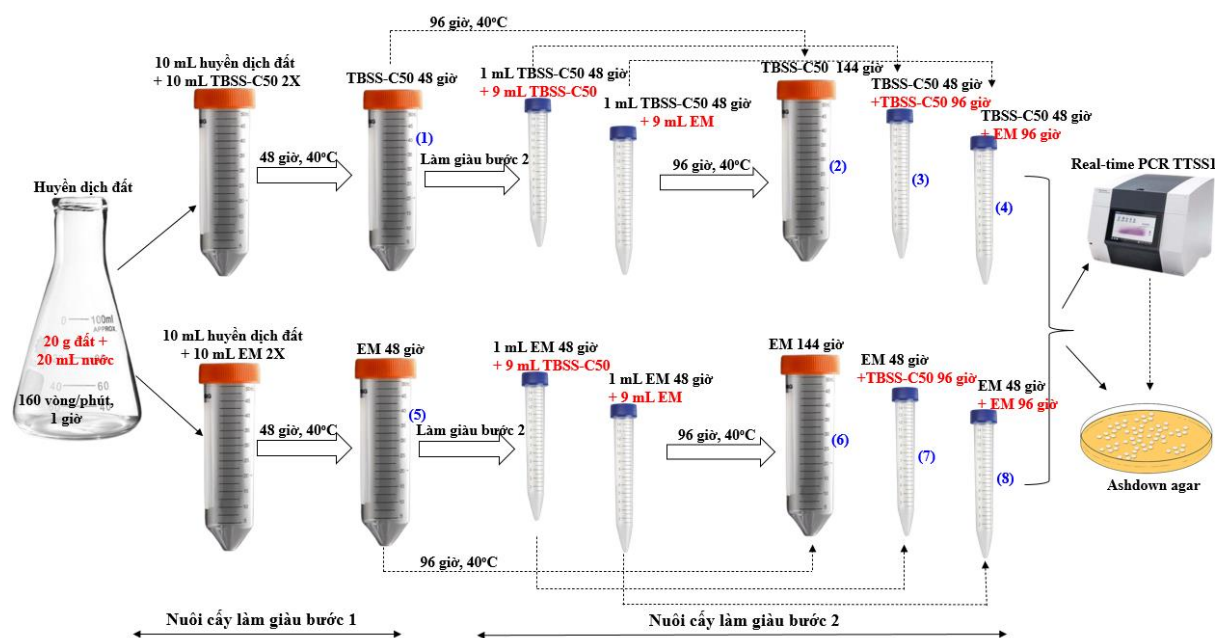
*Nuôi cấy làm giàu bước 2:*

- 1 mL dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ hoặc EM 48 giờ được cấy chuyển sang ống falcon mới chứa 9 mL một trong hai loại môi trường TBSS-C50 hoặc EM và ủ ở 40°C trong 96 giờ.

- Ống nuôi cấy làm giàu TBSS-C50 và EM 48 giờ được ủ tiếp tới 144 giờ.

- Như vậy, qua hai bước nuôi cấy làm giàu, từ một mẫu đất ban đầu sẽ có một bộ gồm 8 mẫu: TBSS-50 48 giờ; TBSS-50 144 giờ; TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ; TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ; EM 48 giờ; EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ; EM 48 giờ + EM 96 giờ; và EM 144 giờ.

- Các dịch nuôi cấy làm giàu này được dùng cho phân tích định tính vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng kỹ thuật cấy trải trên thạch đĩa Ashdown và real-time PCR TTSS1.



**Hình 2.4.** Sơ đồ bố trí thí nghiệm phát triển kỹ thuật nuôi cấy làm giàu để phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường

### 2.2.2.3. Kỹ thuật pha loãng cấy trải

Các dịch làm giàu được pha loãng và cấy trải trên đĩa thạch Ashdown. Sau khi ủ ở 40°C trong 4 ngày, khuẩn lạc *B. pseudomallei* được nhận biết dựa trên đặc điểm hình thái điển hình. Các khuẩn lạc có hình thái nghi ngờ, không điển hình được định danh bằng real-time PCR TTSS1.

### 2.2.2.4. Kỹ thuật real-time PCR TTSS1

Hút 0,5 mL mỗi loại dịch làm giàu vào ống eppendorf 1,5 mL và ly tâm 8.000 vòng/phút trong 10 phút, thu cặn tế bào. Bổ sung 200  $\mu$ L đệm phá tế bào [Tris HCl 100 mM; Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, NaCl 1,5 M; cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 1%, pH 8,0]; 10  $\mu$ L lysozyme (50 mg/mL) và 2,5  $\mu$ L protease K (10 mg/mL) và ủ ở 37°C trong 30 phút. Bổ sung 50  $\mu$ L SDS (20% w/v) tiếp tục ủ ở 65°C trong 2 giờ. Thêm vào hỗn hợp 265  $\mu$ L chloroform: isoamyl alcohol (49:1) và trộn đều bằng cách đảo ống nhẹ nhàng 30 lần. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó hút 100  $\mu$ L dịch nổi được hút sang ống eppendorf mới và thêm 60  $\mu$ L isopropanol, ủ ở -20°C trong 2 giờ để kết tủa DNA. Ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút thu cặn DNA, sau đó rửa hai lần với ethanol 70% lạnh, làm khô ở nhiệt độ phòng và hòa tan trong 50  $\mu$ L nước MQ. Định lượng DNA bằng máy NanoDrop 2000.

DNA *B. pseudomallei* có trong dịch làm giàu được định lượng bằng real-time PCR TTSS1 (Novak et al., 2006). Phản ứng real-time PCR 25  $\mu$ L bao gồm các thành phần 12,5  $\mu$ L qPCR Mastermix 2X; 8  $\mu$ L nước MQ; 1  $\mu$ L mỗi xuôi BpTT4176F (500 nM/ $\mu$ L phản ứng); 1  $\mu$ L mỗi ngược BpTT4290R (500 nM/ $\mu$ L phản ứng); 0,65  $\mu$ L đầu dò BpTT4208P (320  $\mu$ M/ $\mu$ L phản ứng); 1  $\mu$ L DNA vi khuẩn. Trình tự mỗi và đầu dò được trình bày tại Bảng 2.9. Phản ứng real-time PCR TTSS1 được thực hiện trên máy Mastercycler ep realplex real-time PCR system với chu trình nhiệt 50°C trong 2 phút để kích hoạt uracil DNA glycosylase (UDG), 95°C trong 5 phút; 40 chu kỳ nhiệt 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút. Tải lượng DNA *B. pseudomallei* trong dịch làm giàu được thể hiện bằng giá trị cycle threshold ( $C_T$ ) được tính toán tự động nhờ phần mềm realplex version 2.2. Mẫu có kết quả

ương tính với real-time PCR được định nghĩa là sự xuất hiện đường cong huỳnh quang trên ngưỡng. Các mẫu có giá trị  $C_T$  trên 35 được lặp lại phản ứng real-time PCR và so sánh giá trị  $C_T$  (Novak et al., 2006).

**Bảng 2.11.** Trình tự môi và đầu dò của real-time PCR TTSS1 (Novak et al., 2006)

Thành phần	Trình tự (5' - 3')
Mồi xuôi BpTT4176F	CGTCTCTATACTGTCGAGCAATCG
Mồi ngược BpTT4290R	CGTGCACACCGGTCAGTATC
Đầu dò BpTT4208P <sup>a</sup>	CCGGAATCTGGATCACCACCACTTCC

<sup>a</sup> Đầu 5' được gắn với 6-carboxyfluorescein, đầu 3' được gắn với Black Hole Quencher 1

### 2.3.3. Định lượng vi khuẩn *B. pseudomallei* từ mẫu môi trường

Đối với mẫu đất: 10 g đất được cân vào bình tam giác 250 mL có chứa 20 mL nước cất vô trùng. Hỗn hợp được lắc 160 vòng/phút trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng để giải phóng vi khuẩn có trong hạt đất ra môi trường nước. Bình tam giác sau đó được để tĩnh trong 30 phút nhằm lắng các hạt đất. Hút 100  $\mu$ L dịch huyền phù và pha loãng theo dãy thập phân. Trộn 100  $\mu$ L dịch pha loãng ở mỗi cấp độ pha loãng lên đĩa thạch Ashdown, ủ đĩa ở 40°C trong 4 ngày. Mật độ các khuẩn lạc nghi ngờ *B. pseudomallei* được xác định theo mô tả của Trịnh Thành Trung và cs (Trung et al., 2011).

Đối với mẫu nước: 100  $\mu$ L nước được trộn trực tiếp lên môi trường đĩa thạch Ashdown và ủ ở 40°C trong 4 ngày. Những khuẩn lạc nghi ngờ *B. pseudomallei* được đếm và xác định mật độ.

### 2.2.4. Phương pháp phân tích đa hình trình tự các kiểu gen MLST

Phản ứng PCR khuếch đại 7 house-keeping gene được tiến hành với tổng thể tích 25  $\mu$ L (PCR master mix 12,5  $\mu$ L; BSA (1 mg/mL) 0,5  $\mu$ L; DNA khuôn 1  $\mu$ L; mồi xuôi 1  $\mu$ L; mồi ngược 1  $\mu$ L và nước MQ bổ sung đến đủ 25  $\mu$ L). Trình tự các cặp mồi được tham khảo từ nghiên cứu của Godoy và cs (2003) (Bảng 2.7). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 62°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút); 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% trước khi tinh sạch và giải trình gen.

**Bảng 2.12.** Trình tự môi và kích thước dự đoán 7 house-keeping gene (Godoy et al., 2003)

Locus	Môi	Trình tự (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>ace</i>	Ace-dn	CGGCGCTTCTCAAAACGATA	616
	Ace-up	GAATCGCCTTCACCATGTC	
<i>gltB</i>	<i>gltB</i> -dn	TTCAGCACGAGCGTCTGCTG	646
	<i>gltB</i> -up	ACGCTCGCGATCGCGATGAA	
<i>gmhD</i>	<i>gmhD</i> -dn	GAAGCACTGGTACTTGCC	558
	<i>gmhD</i> -up	GCAGTTCCTGTATGCGTC	
<i>lepA</i>	<i>lepA</i> -dn	CACGAGCATCACGACGCCG	623
	<i>lepA</i> -up	CATATTCGCAATTTCTCGATC	
<i>lipA</i>	<i>lipA</i> -up	GGCACCGCGACGTTTCATG	461
	<i>lipA</i> -dn	GACCATCAGGCCCGATTTCG	
<i>narK</i>	<i>narK</i> -up	CTACTCGTGCGCTGGGAT	615
	<i>narK</i> -dn	GACGATGACGGCAGTCCG	
<i>ndh</i>	<i>ndh</i> -up	AGTCGCGACGTTCTACAC	566
	<i>ndh</i> -dn	CGAGTTGCAGACGAGATAC	

Sắc ký đồ trình tự gen được kiểm tra trên phần mềm Chromas lite 2.1 (Technelysium, South Brisbane, Australia) và sắp xếp bằng ClustalW trong phần mềm MEGA7. Trình tự của các house-keeping gene sau đó được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu PubMLST *B. pseudomallei* để đặt tên cho số alen được kết hợp theo thứ tự *ace*, *gltB*, *gmhD*, *lepA*, *lipA*, *narK* và *ndh* và nhận được số ST (<https://pubmlst.org>) (Godoy et al., 2003).

### 2.2.5. Thống kê xử lý số liệu

Phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm GraphPad Prism version 5.0.2 (GraphPad Software, Inc.). Trong nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis, giá trị OD trung bình của xét nghiệm ELISA của các nhóm huyết thanh khác nhau được so sánh bằng kiểm định Mann-Whitney. Dữ liệu được so sánh bằng kiểm định Chi-square. Đường cong ROC được vẽ bằng cách sử dụng dữ liệu của nhóm melioidosis và các nhóm khác, và diện tích dưới đường cong

ROC (AUROCC) được xác định. Giá trị cut-off tiêu chuẩn được xác định tương ứng với các giá trị độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất.

Trong nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy phát hiện *B. pseudomallei* trong môi trường, sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị  $C_T$  trong phân tích real-time PCR TTSS1 của các tổ hợp nuôi cấy làm giàu được đánh giá bằng hàm Friedman's test. Ngoài ra, hàm Fisher's exact tests được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa số lượng mẫu nuôi cấy được từ các dịch làm giàu dương tính với real time PCR.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm được xác định như sau:

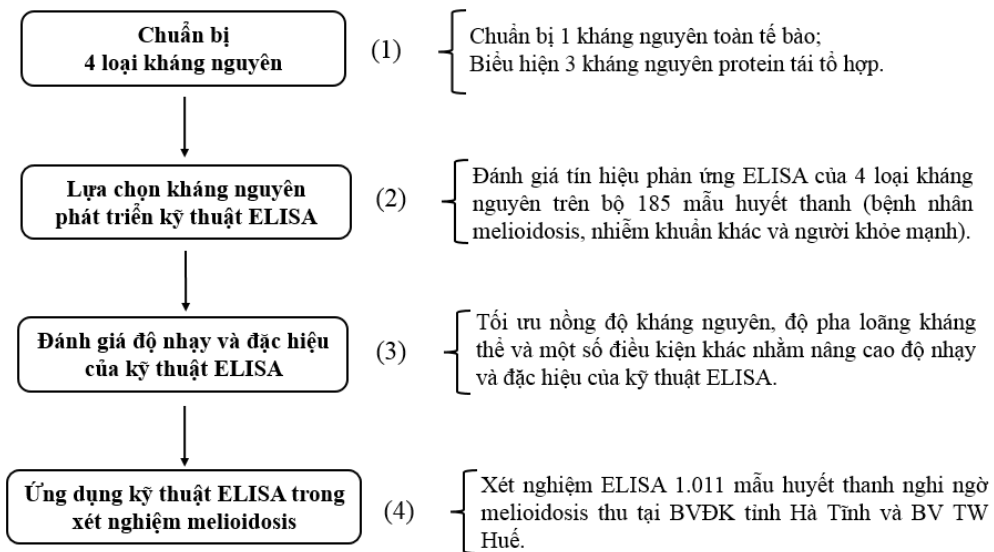
+*Độ nhạy*: được xem là kết quả xét nghiệm dương tính khi thực sự mắc bệnh (tỉ lệ phần trăm giữa số mẫu dương tính thật trên tổng số mẫu dương tính thật và âm tính giả) =  $a / (a+b)$

+*Độ đặc hiệu*: được xem là kết quả âm tính khi thực sự không mắc bệnh (tỉ lệ phần trăm giữa mẫu âm tính thật và tổng số mẫu âm tính thật và dương tính giả) =  $d / (c+d)$

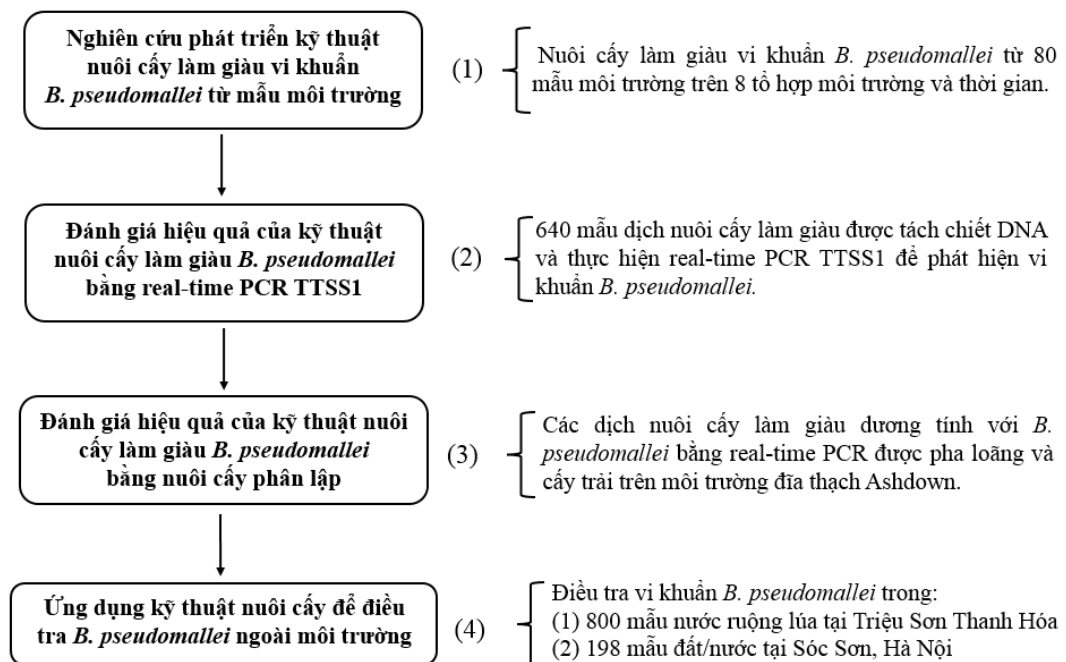
**Bảng 2.13.** Công thức tính độ nhạy và đặc hiệu của xét nghiệm

<b>Xét nghiệm</b>	<b>Mắc bệnh</b>	<b>n</b>	<b>Không mắc bệnh</b>	<b>n</b>	<b>Tổng số</b>
<b>Dương tính</b>	Dương tính thật (TP)	a	Dương tính giả (FP)	c	a+c
<b>Âm tính</b>	Âm tính giả (FN)	b	Âm tính thật (TN)	d	b+d
<b>Tổng số</b>		a+b		c+d	

### 2.2.6. Sơ đồ nghiên cứu



**Hình 2.5.** Sơ đồ các bước nghiên cứu phát triển kỹ thuật xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng



**Hình 2.6.** Sơ đồ các bước nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường



## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

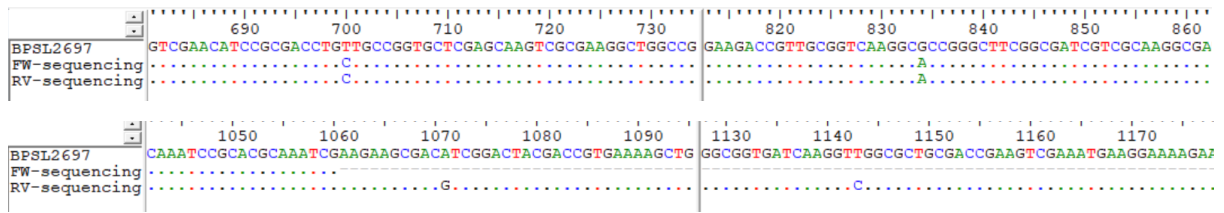
### 3.1. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM NHANH MELIOIDOSIS TỪ MẪU BỆNH PHẪM LÂM SÀNG

#### 3.1.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis

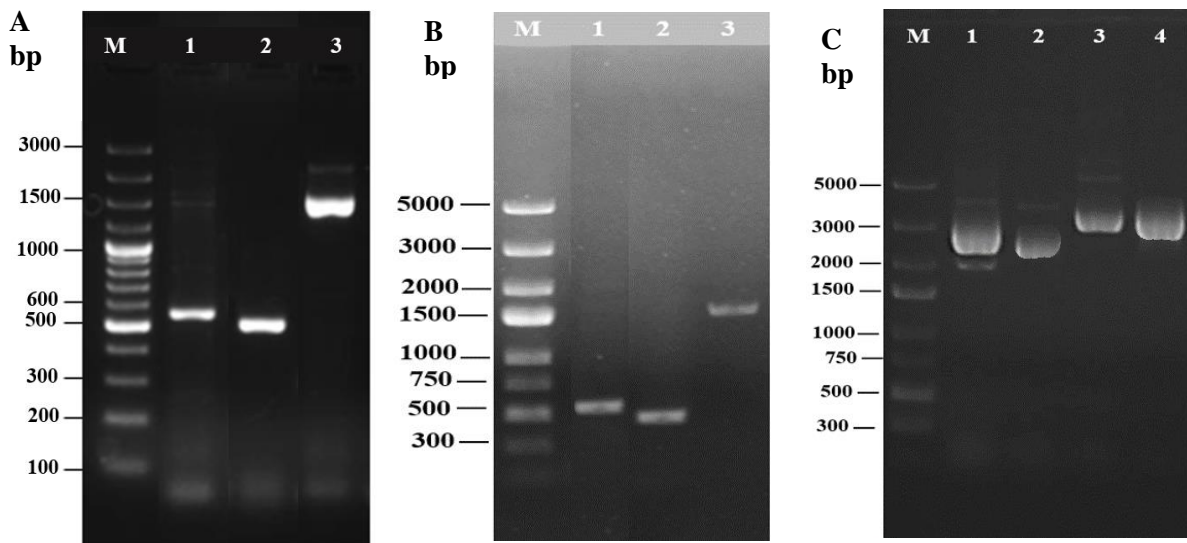
##### 3.1.1.1. Kết quả chuẩn bị kháng nguyên

Kháng nguyên toàn tế bào WC được chuẩn bị từ chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157 và được kiểm tra không phát hiện sự sống sót của tế bào vi khuẩn. Kháng nguyên WC được bảo quản tại  $-70^{\circ}\text{C}$  trong quá trình sử dụng. Theo nghiên cứu, thành phần chủ yếu trong dịch kháng nguyên toàn tế bào là LPS và EPS, trong đó LPS có vai trò kháng nguyên chính trong xét nghiệm ELISA khi so sánh WC-ELISA với LPS-ELISA và EPS-ELISA độ tương đồng tương ứng là 94,1% và 51,3% (Chantratita et al., 2007).

Để chuẩn bị kháng nguyên tái tổ hợp, từ ADN của chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157, các gen *BPSL2096*, *BPSS1498* và *BPSL2697* mã hóa cho các protein AhpC, Hcp1 và GroEL1 đã được khuếch đại thành công với kích thước tương ứng lần lượt là 546 bp, 507 bp và 1.638 bp (Hình 3.2). Sản phẩm PCR được cắt nối vào vector pPSG-IBA3 và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ , lựa chọn các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường LB có X-gal. Sự có mặt của các gen mã hóa protein kháng nguyên trong khuẩn lạc lựa chọn được kiểm tra thông qua phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu và giải trình tự. Kết quả cho thấy trình tự gen mã hóa protein Hcp1 và AhpC tương đồng với trình tự gen tương ứng của chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243. Trong khi đó, trình tự gen mã hóa protein GroEL1 có bốn nucleotide sai khác so với trình tự gen tương ứng của chủng chuẩn ở các vị trí 700 (T $\rightarrow$ C), 843 (G $\rightarrow$ A), 1071 (A $\rightarrow$ G) và 1143 (T $\rightarrow$ C) (Phụ lục 2). Mặc dù vậy, trình tự axit amin được dịch mã của protein GroEL1 không thay đổi. Codon TTG $\Rightarrow$ CTG cùng mã hóa cho Leu234, GCG $\Rightarrow$ GCA cùng mã hóa cho Ala278, ACA $\Rightarrow$ ACG mã hóa cho Thr357, GTT $\Rightarrow$ GTC mã hóa cho Val381 (Hình 3.1).

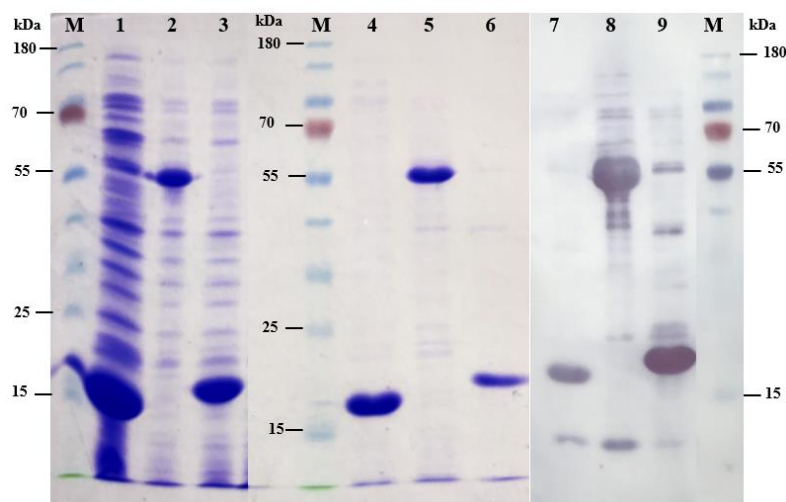


**Hình 3.1.** Kết quả so sánh trình tự gen *BPSL2697* mã hóa protein GroEL từ chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243 và trình tự gen từ vector nhân dòng sử dụng khuôn DNA của chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (BioEdit version 7.2.5)



**Hình 3.2.** Nhân dòng 3 gen mã hóa các kháng nguyên protein. (A) Sản phẩm PCR 3 gen mã hóa kháng nguyên protein: *BPSL2096* (546 bp) (1), *BPSS1498* (507 bp) (2) và *BPSL2697* (1.638 bp) (3) từ chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157. (B) Sản phẩm PCR tinh sạch của 3 gen *BPSL2096* (546 bp) (1), *BPSS1498* (507 bp) (2), *BPSL2697* (1.638 bp) (3). (C) Plasmid pPSG-IBA3 (3.496 bp) (1), pPSG-IBA3:BPSS1498 (3.337 bp) (2), pPSG-IBA3:BPSL2697 (4.468bp) (3) và pPSG-IBA3:BPSL2096 (3.378 bp) (4).

Các plasmid mang gen mong muốn đã được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(DE3) pLysS và biểu hiện thành công các protein kháng nguyên tái tổ hợp. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy trọng lượng phân tử của các protein tái tổ hợp Hcp1, AhpC và GroEL1 có kích thước tương ứng là 20,7; 22,3 và 59,1 kDa (Hình 3.3).



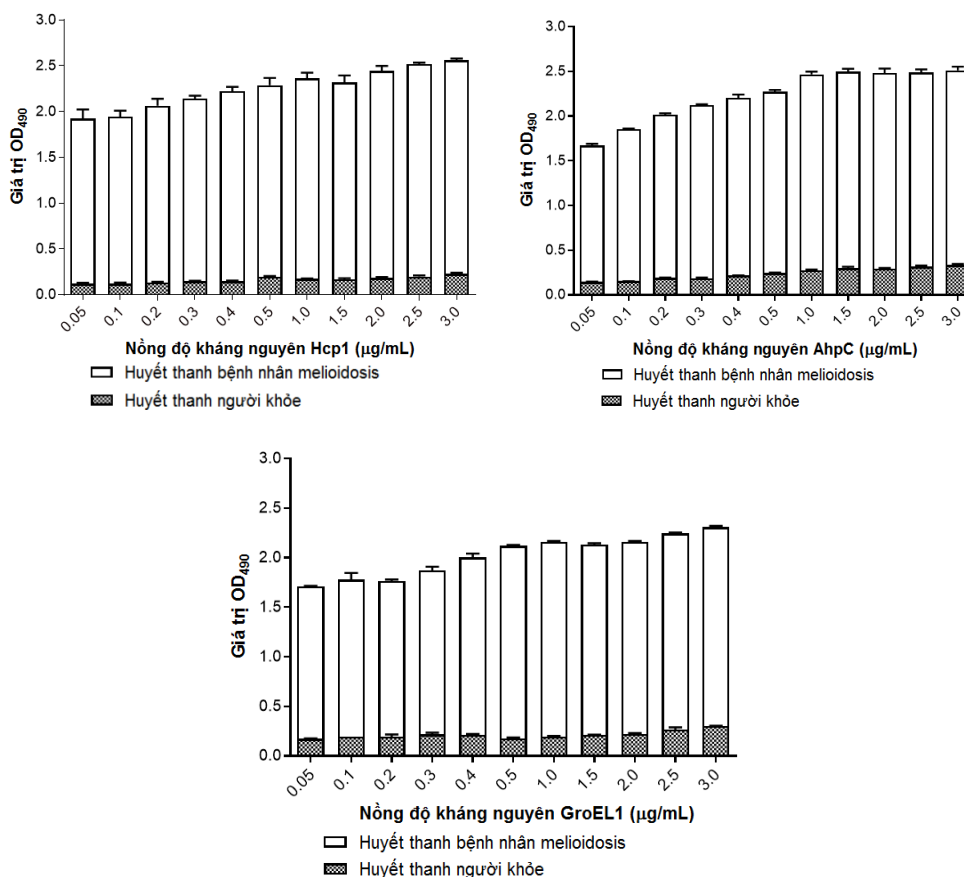
**Hình 3.3.** Biểu hiện của protein tái tổ hợp Hcp1 (1), GroEL1 (2) và AhpC (3) trên tế bào *E. coli* BL21(DE3) pLysS; sản phẩm tinh sạch của Hcp1 (20,7 kDa) (4); GroEL1 (59,1 kDa) (5) và AhpC (22,3 kDa) (6); western blot của protein Hcp1 (7); GroEL1 (8) và AhpC (9) với huyết thanh của bệnh nhân melioidosis. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa.

Các protein tái tổ hợp được xác định nồng độ dựa trên phương trình đường chuẩn Bradford là:  $y = 0,0127x + 0,0836$ , trong đó  $y$  là giá trị  $OD_{595}$ ,  $x$  là nồng độ protein chuẩn BSA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Nồng độ các protein Hcp1, AhpC và GroEL1 được xác định lần lượt là 19,0; 9,9 và 21,4  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.1.1.2. Nồng độ kháng nguyên tối ưu cho xét nghiệm ELISA

Xét nghiệm ELISA sử dụng protein kháng nguyên tái tổ hợp ở dải nồng độ 0,05-3,0  $\mu\text{g/mL}$  cho tín hiệu phát hiện kháng thể IgG của bệnh nhân nhiễm melioidosis khá cao, và tín hiệu nền thấp. Đồng thời, tín hiệu phản ứng của kháng nguyên với huyết thanh người khỏe mạnh tương đối thấp ở cả 3 loại kháng nguyên ( $\leq 0,32$ ). Từ kết quả thu được, trong dải nồng độ kháng nguyên 0,05-1,0  $\mu\text{g/mL}$ , tín hiệu  $OD_{490}$  của mẫu huyết thanh dương tính có giá trị cao nhất ở nồng độ 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Với dải nồng độ kháng nguyên từ 1,0-3,0  $\mu\text{g/mL}$ , kháng nguyên Hcp1 cho tín hiệu  $OD_{490}$  bắt đầu tăng từ nồng độ 2,0  $\mu\text{g/mL}$  (cao hơn  $OD_{490}$  ở nồng độ 1,0  $\mu\text{g/mL}$  là từ 0,102-0,175); đối với kháng nguyên GroEL1 giá trị  $OD_{490}$  tăng từ nồng độ 2,5  $\mu\text{g/mL}$  (cao hơn không đáng kể so với  $OD_{490}$  ở nồng độ 1,0  $\mu\text{g/mL}$  là 0,039-0,061); trong đó kháng nguyên AhpC có giá trị  $OD_{490}$  ổn định ở dải nồng độ này.

Do vậy, kháng nguyên protein có nồng độ là 1  $\mu\text{g/mL}$  (tương đương 0,05  $\mu\text{g}$  kháng nguyên/giếng) được lựa chọn để gắn lên đĩa ELISA (Hình 3.4).



**Hình 3.4.** Giá trị OD<sub>490</sub> của xét nghiệm ELISA sử dụng các kháng nguyên Hcp1, AhpC và GroEL1 ở dải nồng độ 0,05-3,0  $\mu\text{g/mL}$

Trong các công bố trước đây, hàm lượng protein Hcp1 tối ưu được sử dụng cho xét nghiệm ELISA có hàm lượng là 0,125  $\mu\text{g/giếng}$  (Pumpuang et al., 2017) và 0,25  $\mu\text{g/giếng}$  (Hara et al., 2013; Chieng et al., 2015), cao hơn từ 2,5-5 lần so với số liệu công bố của luận án. Với hàm lượng protein Hcp1 được sử dụng trong nghiên cứu của Pumpuang và cs (2017), giá trị OD<sub>490</sub> trung bình ghi nhận được là 3,16 (từ 2,22-3,40) khi xét nghiệm huyết thanh melioidosis pha loãng 1:2.000; trong khi đó giá trị này ở nghiên cứu của Hara và cs (2013) chỉ 0,40 (từ 0,11-2,0) khi xét nghiệm huyết thanh melioidosis pha loãng 1:1.600; còn kết quả nghiên cứu của Chieng và cs (2015) là 0,72 (từ 0,097-2,40) khi xét nghiệm huyết thanh melioidosis pha loãng 1:3.200. Đối với kháng nguyên GroEL1, lượng tối ưu cho xét nghiệm ELISA được Kritsiriwuthinan và cs (2018) công bố là 0,01  $\mu\text{g/giếng}$  (Kritsiriwuthinan et al.,

2018), chỉ bằng 1/5 lượng kháng nguyên của nghiên cứu trong nghiên cứu của luận án. Giá trị OD<sub>490</sub> được nghiên cứu này công bố là 0,79 (từ 0,211-2,189) khi xét nghiệm huyết thanh melioidosis pha loãng 1:1.600 (Bảng 3.1). Trong khi đó, kháng nguyên AhpC chỉ có các công bố về khả năng phát hiện kháng thể kháng *B. pseudomallei* bằng phương pháp MicroArrayStrip với nồng độ protein dùng để gắn lên thanh chip là 0,45 mg/mL (Felgner et al., 2009; Kohler et al., 2016; Wagner et al., 2020).

**Bảng 3.1.** So sánh hàm lượng kháng nguyên dùng cho xét nghiệm ELISA trong nghiên cứu của luận án với các công bố trước

Kháng nguyên	Hàm lượng kháng nguyên (µg/giếng)	Hệ số pha loãng huyết thanh	Giá trị OD trung bình (khoảng)	Nguồn kháng thể	TLTK
Hcp1	0,25	1:1.600	0,40 (0,11-2,0)	Malaysia	Hara et al., 2013
	0,25	1:3.200	0,72 (0,097-2,40)	Malaysia	Chieng et al., 2015
	0,125	1:2.000	3,16 (2,22-3,40)	Thái Lan	Pumpuang et al., 2017
	<b>0,05</b>	<b>1:4.000</b>	<b>2,19 (2,15-2,26)</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>Nghiên cứu này</b>
GroEL1	0,01	1:1.600	0,79 (0,211-2,189)	Thái Lan	Kritsiriwuthinan et al., 2018
	<b>0,05</b>	<b>1:4.000</b>	<b>1,942 (1,935-1,949)</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>Nghiên cứu này</b>

Như vậy, khảo sát hàm lượng kháng nguyên thích hợp gắn lên đĩa ELISA của luận án và của các công bố trước cho thấy giá trị này khác nhau ở mỗi nghiên cứu tùy thuộc vào các yếu tố như độ pha loãng huyết thanh, nguồn huyết thanh sử dụng, giá trị OD<sub>490</sub> và giá trị cut-off mong muốn.

### 3.1.1.3. Lựa chọn kháng nguyên phát triển kỹ thuật ELISA xét nghiệm nhanh melioidosis

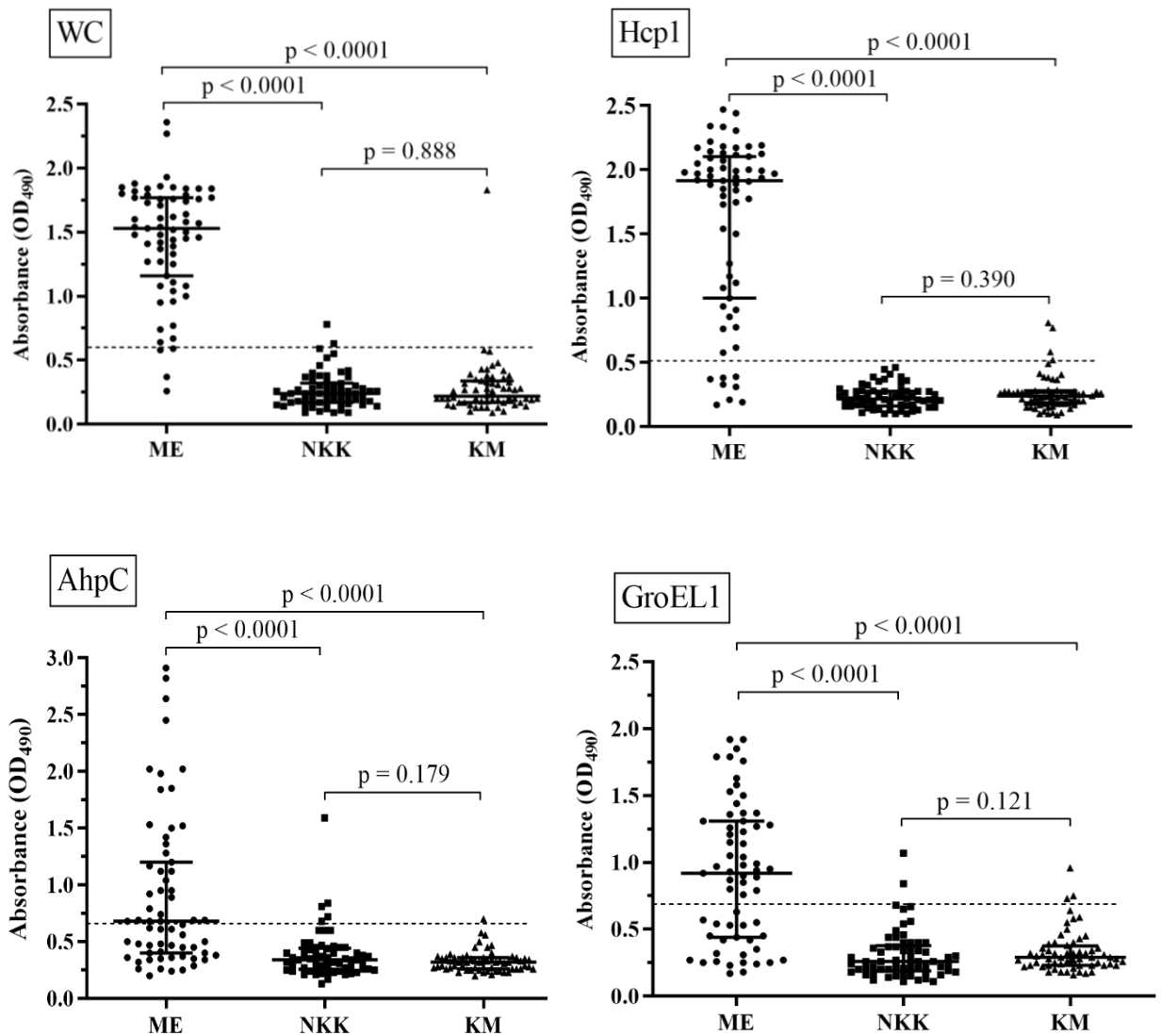
Toàn bộ 4 xét nghiệm ELISA sử dụng kháng nguyên toàn tế bào WC và 3 loại kháng nguyên protein tái tổ hợp (gồm Hcp1, GroEL1 và AhpC) được đánh giá trên bộ 185 mẫu huyết thanh. Kết quả cho thấy giá trị OD trung bình của

nhóm bệnh nhân melioidosis cao hơn đáng kể so với của hai nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn khác và nhóm người khỏe mạnh ( $P < 0,0001$ ) (Hình 3.5), và giá trị OD trung bình của nhóm các bệnh nhiễm trùng khác bằng với giá trị OD của nhóm người khỏe mạnh ( $P > 0,05$ ). Tỷ lệ giữa giá trị OD trung bình của nhóm nhiễm melioidosis và nhóm khỏe mạnh lần lượt là 6,95; 8,00; 3,17 và 2,13 đối với WC-ELISA, Hcp1-ELISA, GroEL1-ELISA và AhpC-ELISA. Xét nghiệm Hcp1-ELISA cho giá trị OD trung bình cao nhất trên nhóm melioidosis [1,916; IQR (1,002-2,103)]. Giá trị OD trung bình này cao hơn đáng kể so với WC-ELISA [1,530; IQR (1,160-1,770);  $p = 0,001$ ], GroEL1-ELISA [0,920; IQR (0,440-1,310);  $p < 0,0001$ ], và AhpC-ELISA [0,680; IQR (0,400-1,00);  $p < 0,0001$ ] (Bảng 3.2).

**Bảng 3.2.** Giá trị OD<sub>490</sub> trung bình của các xét nghiệm WC/Hcp1/AhpC/GroEL1-ELISA sử dụng bộ 185 mẫu huyết thanh

Mẫu huyết thanh	Giá trị OD <sub>490</sub>			
	WC-ELISA	Hcp1-ELISA	GroEL1-ELISA	AhpC-ELISA
<b>Melioidosis</b>	1,530±0,213	1,916±0,479	0,920±0,26	0,680±0,452
<b>Nhiễm khuẩn khác</b>	0,240±0,019	0,215±0,006	0,260±0,033	0,340±0,045
<b>Khỏe mạnh</b>	0,220±0,036	0,240±0,0134	0,290±0,029	0,320±0,028
<b>IQR*</b>	1,160-1,770	1,002-2,103	0,440-1,310	0,400-1,000

\* Interquartile range (giá trị trung bình trong khoảng)



**Hình 3.5.** Giá trị OD<sub>490</sub> của các xét nghiệm WC/Hcp1/AhpC/GroEL1-ELISA sử dụng bộ 185 mẫu huyết thanh của các nhóm (1) bệnh nhân melioidosis (ME, n=63); (2) bệnh nhân nhiễm khuẩn khác (NKK, n=62) và người khỏe mạnh (KM, n=60). Nét đứt ngang thể hiện giá trị cut-off của mỗi xét nghiệm ELISA đảm bảo độ đặc hiệu >95%. Thanh bar thể hiện giá trị trung bình trong khoảng IQR (Interquartile range). Giá trị P được tính toán sử dụng hàm t-test của phần mềm GraphPad Prism version 5.0.2.

Đường cong ROC biểu diễn mối tương quan giữa giá trị cut-off và độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA. Diện tích dưới đường cong ROC (AUROCC) của xét nghiệm WC-ELISA (0,982) và Hcp1-ELISA (0,957) cao hơn so với GroEL1-ELISA (0,854) và AhpC-ELISA (0,832). Giá trị cut-off được ước tính để tất cả các xét nghiệm ELISA đạt được độ đặc hiệu trên 95%. Ở ngưỡng cut-off là

0,60; độ nhạy và độ đặc hiệu của WC-ELISA tương ứng là 93,7% và 97,5%. Ở ngưỡng cut-off là 0,50; độ nhạy và độ đặc hiệu của Hcp1-ELISA lần lượt là 87,3% và 96,7%. Ở ngưỡng cut-off là 0,68, độ nhạy và độ đặc hiệu của GroEL1-ELISA lần lượt là 61,9% và 95,1%. Ở ngưỡng cut-off là 0,6, độ nhạy và độ đặc hiệu của AhpC-ELISA lần lượt là 57,1% và 95,1% (Bảng 3.3).

**Bảng 3.3:** Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA sử dụng 4 loại kháng nguyên

<b>Kháng nguyên</b>	<b>AUROC (95% CI)</b>	<b>Giá trị cut-off OD<sub>490</sub></b>	<b>Độ nhạy (%)</b>	<b>Độ đặc hiệu (%)</b>
WC	0,982 (0,961 – 1,000)	0,60	93,7	97,5
Hcp1	0,957 (0,921 – 0,994)	0,50	87,3	96,7
GroEL1	0,854 (0,791 – 0,917)	0,68	61,9	95,1
AhpC	0,832 (0,766 – 0,899)	0,61	57,1	95,1

AUROC: Diện tích dưới đường cong ROC (Area under the Receiver Operating Characteristic Curve); CI: Khoảng tin cậy (Confidence Interval)

Khi kết hợp hai kết quả xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA, độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh được tính theo công thức tại Bảng 3.4 với giá trị tương ứng là 98,4% và 95,1%. Độ nhạy thu được cao hơn độ nhạy của các xét nghiệm riêng lẻ, đồng thời độ đặc hiệu đảm bảo không quá 5% sai số. Vì vậy, xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã được đề xuất để chẩn đoán huyết thanh bệnh nhân nghi nhiễm melioidosis.

**Bảng 3.4.** Độ nhạy và đặc hiệu của xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1- ELISA đánh giá trên bộ 185 mẫu huyết thanh

<b>Xét nghiệm</b>	<b>Melioidosis</b>	<b>n</b>	<b>Không mắc melioidosis</b>	<b>n</b>
<b>Dương tính</b>	Dương tính thật	a=62	Dương tính giả	c=6
<b>Âm tính</b>	Âm tính giả	b=1	Âm tính thật	d=116
<b>Tổng số</b>		a+b=63		c+d=122
<b>Độ nhạy</b>		$(a/a+b)*100\%=98,4\%$	<b>Độ đặc hiệu</b>	$(c/c+d)*100\%=95,1\%$



Kết quả của luận án có sự tương đồng với kết quả đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó với giá trị OD trung bình cao nhất được ghi nhận ở xét nghiệm Hcp1-ELISA so với WC-ELISA hoặc OPS-ELISA khi nghiên cứu trên bệnh nhân melioidosis ở Thái Lan (Pumpuang et al., 2017) hoặc ở Malaysia (Chieng et al., 2015). Mặt khác, Kohler và cs (2016) đã báo cáo GroEL1 và AhpC trên microarray có cường độ tín hiệu trung bình cao nhất đối với huyết thanh của nhóm bệnh nhân melioidosis (Kohler et al., 2016). Trong khi đó, giá trị OD trung bình của GroEL1-ELISA và AhpC-ELISA trong luận án là thấp mặc dù cả hai xét nghiệm đều phát hiện kháng thể IgG trong huyết thanh người. Sự khác biệt này có thể là do huyết thanh sử dụng được thu thập từ các quần thể người khác nhau, hoặc do sự khác biệt về kỹ thuật.

Trong nghiên cứu của luận án, giá trị cut-off OD<sub>490</sub> của 4 xét nghiệm ELISA tương đối cao ( $\geq 0,5$ ) là tương đối cao so với các xét nghiệm ELISA nói chung, mặc dù huyết thanh được pha loãng 1:4.000. Việc lựa chọn giá trị cut-off trong nghiên cứu này đảm bảo cho độ đặc hiệu trên 95%, đồng thời, Việt Nam thuộc vùng dịch tễ melioidosis, nên người dân có thể phơi nhiễm với tác nhân gây bệnh dẫn đến tín hiệu nền của huyết thanh thường cao hơn các vùng không có dịch. So sánh với xét nghiệm ELISA melioidosis, giá trị cut-off của Hcp1-ELISA trong luận án thấp hơn so với công bố của Pumpuang và cs (2017) tại Thái Lan nhưng cao hơn công bố của Hara và cs (2013) và Chieng và cs (2015) tại Malaysia. Tương tự, giá trị cut-off của WC-ELISA trong luận án thấp hơn so với công bố của Suttisunhakul và cs (2016) tại Thái Lan nhưng cao hơn công bố của Chantratita và cs (2007) tại Thái Lan và Chieng và cs (2015) tại Malaysia. Trong khi đó, xét nghiệm GroEL1-ELISA trong luận án có giá trị cut-off cao hơn so với công bố của Kritsiriwuthinan và cs (2018) tại Thái Lan, tuy nhiên, giá trị cut-off thấp trong nghiên cứu của Kritsiriwuthinan đã dẫn đến độ đặc hiệu thấp (88%) dẫn đến tỉ lệ dương tính giả cao (Bảng 3.5).

**Bảng 3.5.** So sánh giá trị cut-off OD<sub>490</sub>, độ nhạy và độ đặc hiệu của 3 xét nghiệm ELISA trong nghiên cứu của luận án với các công bố trước

Kháng nguyên	Giá trị cut-off OD <sub>490</sub>	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	Nguồn huyết thanh	TLTK
Hcp1	0,109	71	96	Malaysia	Hara et al., 2013
	0,097	93,7	100	Malaysia	Chieng et al., 2015
	1,165	83	96,3	Thái Lan	Pumpuang et al., 2017
	<b>0,50</b>	<b>87,3</b>	<b>96,7</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>Nghiên cứu này</b>
GroEL1	0,211	92	88	Thái Lan	Kritsiriwuthinan et al., 2018
	<b>0,68</b>	<b>61,9</b>	<b>95,1</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>Nghiên cứu này</b>
WC	0,482	81	70	Thái Lan	Chantratita et al., 2007
	0,168	65,6	90	Malaysia	Chieng et al., 2015
	0,83	70,2	95,7	Thai Lan	Suttisunhakul et al., 2016
	<b>0,60</b>	<b>93,7</b>	<b>97,5</b>	<b>Việt Nam</b>	<b>Nghiên cứu này</b>

Suttisunhakul và cs (2016) đã báo cáo giá trị AUROCC, độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm WC-ELISA là cao nhất và tương đương với xét nghiệm OPS-ELISA (Suttisunhakul et al., 2016). Trong khi đó, Pumpuang và cs (2017) đã báo cáo giá trị AUROCC, độ nhạy và độ đặc hiệu của Hcp1-ELISA là cao hơn so với OPS-ELISA (Pumpuang et al., 2017), mặc dù OPS đã được chứng minh là kháng nguyên chủ yếu được nhận biết bởi các kháng thể của người (Suttisunhakul et al., 2016). Tương tự, Chieng và cs (2015) công bố Hcp1-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn WC-ELISA (Chieng et al., 2015). Gần đây, Hcp1 đã được sử dụng làm kháng nguyên đích duy nhất trong xét nghiệm nhanh sắc ký miễn dịch ICT và cho kết quả tương đồng với Hcp1-ELISA trong chẩn đoán melioidosis (Phokrai et al., 2018). Bên cạnh đó, để tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh giữa các nhóm bệnh nhân melioidosis khác nhau, Hcp1 được sử dụng kết hợp với ba loại kháng nguyên protein tái tổ hợp khác gồm AhpC, GroEL1 và GroL trên cùng một xét nghiệm và cho hiệu quả chẩn đoán huyết thanh tăng lên

đáng kể (Wagner et al., 2020). Trong nghiên cứu này, WC-ELISA thể hiện giá trị AUROCC, độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn không đáng kể so với Hcp1-ELISA. Sự khác biệt này có thể là do các nghiên cứu đã sử dụng các chủng *B. pseudomallei* khác nhau để chuẩn bị kháng nguyên WC. Ngoài ra, các yếu tố khác như thời điểm thu mẫu huyết thanh hoặc đặc tính của người cho mẫu cũng ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

### **3.1.2. Đánh giá hiệu quả xét nghiệm melioidosis của WC/Hcp1-ELISA**

Từ ngày 7/10-15/11/2020, khu vực Bắc đến Trung Trung Bộ đã hứng chịu 9 trận mưa, bão và hoàn lưu bão. Các hiện tượng thời tiết cực đoan liên tiếp này đã gây ra mưa lớn kéo dài, với lượng mưa tích lũy đạt đỉnh trên 3.000 mm ở một số địa điểm trong thời gian ngắn, dẫn đến một số trận lũ lụt lớn và làm ùn ứ nhiều rác thải và bùn đất trong các khu dân sinh. Việc tiếp xúc với đất hoặc nước và lượng mưa dày đặc được báo cáo là có mối tương quan cao với số ca nhiễm melioidosis (Currie et al., 2003; Limmathurotsakul et al., 2013), do vậy nghiên cứu này đã tiến hành xét nghiệm mẫu huyết thanh của những bệnh nhân nghi ngờ nhiễm melioidosis nhập viện tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh và BV TƯ Huế trong thời gian này. Các bệnh nhân nội trú và ngoại trú hoặc các chỉ định lâm sàng về việc khám và điều trị của bệnh nhân đều được các bệnh viện thực hiện theo quy trình thường quy. Khi bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm vi sinh, quy trình xử lý bệnh phẩm và nuôi cấy vi sinh được thực hiện theo hướng dẫn được mô tả ở nghiên cứu trước đây (Lê Huy Chính, 2007; Trung et al. 2018).

#### *3.1.2.1. Kết quả ứng dụng WC/Hcp1-ELISA xét nghiệm melioidosis tại BV TƯ Huế*

Từ ngày 28/10-21/11/2020, tại BV TƯ Huế có 500 mẫu huyết thanh được thu thập từ các bệnh nhân có triệu chứng nghi ngờ nhiễm melioidosis. Xét nghiệm bằng kỹ thuật WC/Hcp1-ELISA đã phát hiện 41 (8,2%) mẫu huyết thanh dương tính với melioidosis (Bảng 3.6), tương đương với kết quả xét nghiệm WC-ELISA, trong khi đó xét nghiệm Hcp1-ELISA chỉ phát hiện 24 (4,8%) mẫu ( $p < 0,05$ ). Đáng

chú ý là 24 (100%) mẫu huyết thanh dương tính với Hcp1-ELISA cũng dương tính với WC-ELISA.

**Bảng 3.6.** Kết quả xét nghiệm ELISA mẫu huyết thanh thu thập tại BV TƯ Huế dương tính với melioidosis

Bệnh viện	WC-ELISA (cut-off > 0,60)	Hcp1-ELISA (cut-off > 0,50)	Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA
BV TƯ Huế (n=500)	41 (8,2%)	24 (4,8%)	41 (8,2%)

Trong số 500 bệnh nhân được xét nghiệm, có 23 (4,6%) người được chẩn đoán nhiễm melioidosis bằng xét nghiệm nuôi cấy. Xét nghiệm WC-ELISA, Hcp1-ELISA và kết hợp WC/Hcp1-ELISA đối với nhóm bệnh nhân này đã phát hiện lần lượt 21/23 (91,3%), 12/23 (52,2%) và 21/23 (91,3%) bệnh nhân nhiễm melioidosis (Bảng 3.7). Dữ liệu xét nghiệm ELISA huyết thanh cho thấy khả năng phát hiện melioidosis của WC-ELISA là cao hơn so với Hcp1-ELISA. So với phương pháp nuôi cấy, xét nghiệm ELISA đã không phát hiện được 2/23 (8,7%) trường hợp dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy.

**Bảng 3.7.** Các ca dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy dương tính với xét nghiệm ELISA tại BV TƯ Huế

Bệnh viện	Số ca dương tính melioidosis được phát hiện			
	Nuôi cấy	WC-ELISA	Hcp1-ELISA	WC/Hcp1-ELISA
BV TƯ Huế (n=500)	23	21 (91,3%)	12 (52,2%)	21 (91,3%)

Trong số 41 bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm ELISA, ngoài 21 (51,2%) bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm nuôi cấy, còn lại 12 (29,3%) bệnh nhân dương tính với xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA nhưng âm tính với *B. pseudomallei* bằng phương pháp nuôi cấy, và 8 (19,5%) bệnh nhân không được chỉ định xét nghiệm vi sinh (Bảng 3.8). Dữ liệu này phần nào cho thấy những bất cập trong xét nghiệm nuôi cấy vi sinh tại các bệnh viện.

**Bảng 3.8.** Số bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng ELISA và bệnh nhân được chỉ định nuôi cấy và không nuôi cấy vi sinh tại BV TƯ Huế

Bệnh viện	Số ca dương tính với melioidosis bằng WC/Hcp1-ELISA	Số ca dương tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy	Số ca âm tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy	Số ca không được nuôi cấy
BV TƯ Huế (n=500)	41	21 (51,2%)	12 (29,3%)	8 (19,5%)

Một nghiên cứu trước đây đã công bố kháng nguyên có bản chất là polysaccharide có thể chiếm đa số trong kháng nguyên WC (Pumpuang et al., 2017), trong khi Hcp1 là protein kháng nguyên duy nhất. Các loại kháng nguyên polysaccharide khác nhau trong dịch kháng nguyên toàn tế bào có thể kích thích các con đường miễn dịch khác nhau. Hơn nữa, các lớp và phân lớp kháng thể đa dạng ở các nhóm bệnh nhân melioidosis có các đặc điểm lâm sàng riêng biệt (như đái tháo đường và không đái tháo đường, hoặc nhiễm và không nhiễm khuẩn huyết) sẽ phản ứng khác nhau với các biến thể kháng nguyên của *B. pseudomallei* (Wikraiphat et al., 2015; Pumpuang et al., 2019). Chính vì vậy, yếu tố kháng nguyên và vật chủ có thể đã góp phần vào sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân nhiễm melioidosis. Từ đó dẫn đến sự khác biệt trong tỉ lệ dương tính với melioidosis ở xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA trong nghiên cứu này.

Trường hợp ELISA âm tính giả cũng được Suttisunhakul và cs (2016) báo cáo với 20% số bệnh nhân melioidosis không có kháng thể IgG đặc hiệu với tất cả các xét nghiệm OPS/CPS/WC/CF-ELISA (Suttisunhakul et al., 2016.). Phokrai và cs (2018) cũng thống kê khoảng 10% bệnh nhân melioidosis không tạo kháng thể đặc hiệu với Hcp1 (Phokrai et al., 2018). Hiện tượng này có thể do tình trạng suy giảm miễn dịch ở một số bệnh nhân hoặc bệnh nhân nhập viện ngay khi khởi phát nhiễm trùng và các kháng thể IgG đáp ứng với kháng nguyên *B. pseudomallei* vẫn chưa được tạo thành tại thời điểm lấy huyết thanh cho xét nghiệm ELISA. Do vậy, việc lặp lại xét nghiệm ELISA ở các thời điểm khác nhau, kết hợp đánh giá tiền sử và tiến triển của bệnh nhân cần được cân nhắc thực hiện.

### 3.1.2.2. Kết quả ứng dụng WC/Hcp1-ELISA xét nghiệm melioidosis tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh

Tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh, có 511 mẫu huyết thanh được thu từ ngày 2-25/11/2020 sau đợt mưa lũ dài ngày. Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA phát hiện 52 (10,2%) mẫu huyết thanh dương tính với melioidosis. Hai xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA cho số lượng huyết thanh dương tính với melioidosis tương đương nhau ( $p > 0,05$ ) tương ứng là 39 (7,6%) và 34 (6,7%) (Bảng 3.9). Tuy nhiên, chỉ có 21 (61,7%) mẫu huyết thanh dương tính bằng Hcp1-ELISA cũng dương tính với WC-ELISA, trong khi số lượng này ở BV TƯ Huế là 24 (100%). Mặc dù vậy, cả hai xét nghiệm đều phát hiện 13/14 (92,8%) ca bệnh melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy. Để giải thích hiện tượng xét nghiệm WC-ELISA cho kết quả bao trùm xét nghiệm Hcp1-ELISA thấp ở BVĐK tỉnh Hà Tĩnh là do ngẫu nhiên hay do đặc điểm miễn dịch đặc trưng của người dân theo vùng miền thì cần phải có các nghiên cứu về miễn dịch học của người dân, và dịch tễ học phân tử của vi khuẩn *B. pseudomallei*.

**Bảng 3.9.** Kết quả xét nghiệm ELISA mẫu huyết thanh thu thập tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh dương tính với melioidosis

Bệnh viện	WC-ELISA (cut-off > 0,60)	Hcp1-ELISA (cut-off > 0,50)	Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA
BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511)	39 (7,6%)	34 (6,7%)	52 (10,2%)

Trong số 511 bệnh nhân được xét nghiệm ELISA, có 14 (2,8%) bệnh nhân dương tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy. Cả hai xét nghiệm độc lập WC-ELISA và Hcp1-ELISA đều phát hiện được 13/14 (92,8%) trường hợp dương tính trong nhóm bệnh nhân này. Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đã phát hiện 14/14 (100%) ca nhiễm melioidosis được xác nhận bằng nuôi cấy vi sinh (Bảng 3.10).

**Bảng 3.10.** Các ca dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy dương tính với xét nghiệm ELISA tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh

Bệnh viện	Số ca dương tính melioidosis được phát hiện			
	Nuôi cấy	WC-ELISA	Hcp1-ELISA	WC/Hcp1-ELISA
BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511)	14	13 (92,8%)	13 (92,8%)	14 (100%)

Tương tự như ở BV TƯ Huế, trong số 52 bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA, chỉ có 14 bệnh nhân dương tính với melioidosis được phát hiện bằng xét nghiệm nuôi cấy, còn lại có 12 (23,1%) bệnh nhân âm tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy và 26 (50%) bệnh nhân không được chỉ định làm xét nghiệm nuôi cấy vi sinh (Bảng 3.11).

**Bảng 3.11.** Số bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng ELISA và bệnh nhân được chỉ định nuôi cấy và không nuôi cấy vi sinh tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh

Bệnh viện	Số ca dương tính với melioidosis bằng WC/Hcp1-ELISA	Số ca dương tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy	Số ca âm tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy	Số ca không được nuôi cấy
BVĐK tỉnh Hà Tĩnh (n=511)	52	14 (26,9%)	12 (23,1%)	26 (50%)

Tuy xét nghiệm nuôi cấy là “tiêu chuẩn vàng” trong chẩn đoán nhiễm trùng melioidosis nhưng có một số hạn chế, như độ nhạy phát hiện *B. pseudomallei* thấp và có thể xác định sai tác nhân gây bệnh (Limmathurotsakul et al., 2010; Hoffmaster et al., 2015). Độ nhạy thấp của xét nghiệm nuôi cấy có thể do lượng vi khuẩn trong mẫu máu của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tương đối thấp (0,2-7,7 CFU/mL) (Wuthiekanun et al., 2007). Vì vậy, những bệnh nhân nhiễm trùng dai dẳng kèm theo các yếu tố nguy cơ nhiễm melioidosis cần được xét nghiệm nuôi cấy lặp lại nhiều lần. Tuy nhiên, số lượng chỉ định xét nghiệm nuôi cấy vi sinh cho bệnh nhân bị sốt còn khá thấp đã được báo cáo ở nhiều nước đang phát triển do nguồn lực tài chính và nhân lực còn hạn chế. Hơn nữa, việc điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm cho các bệnh truyền nhiễm thường là lựa chọn được ưu tiên (Teerawattanasook et al., 2017; Hemlock et al., 2020). Những yếu tố này có thể góp phần vào việc không chẩn đoán được hoặc bỏ sót ca nhiễm melioidosis. Do đó, luận

án đã thực hiện nội dung nghiên cứu điều tra tình trạng của những bệnh nhân âm tính với melioidosis bằng nuôi cấy/hoặc không được chỉ định nuôi cấy nhưng có huyết thanh dương tính với xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA.

Tháng 8/2021, 9 tháng sau khi xét nghiệm huyết thanh, 38 bệnh nhân tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh đã được điều tra. Đây là những bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng xét nghiệm WC/Hcp1-ELISA nhưng âm tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy hoặc không được chỉ định xét nghiệm nuôi cấy vi sinh. Căn cứ vào kết quả điều tra, 38 bệnh nhân được chia thành bốn nhóm (i) bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis (n = 2; 5,3%); (ii) bệnh nhân tử vong (n = 9; 23,7%); (iii) bệnh nhân không khỏe mạnh (n = 17; 44,7%); và (iv) người khỏe mạnh (n = 10; 26,3%). Giá trị OD<sub>490</sub> trung bình của WC-ELISA và Hcp1-ELISA không cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm này (Bảng 3.12).

**Bảng 3.12.** Thông tin 38 bệnh nhân dương tính với WC/Hcp1-ELISA, âm tính với *B. pseudomallei* bằng nuôi cấy hoặc không chỉ định nuôi cấy

TT	Nhóm bệnh nhân	Số lượng (%)	Nuôi cấy/Không nuôi cấy vi sinh	WC-ELISA (trung bình OD <sub>490</sub> )	Hcp1-ELISA (trung bình OD <sub>490</sub> )
1	Bệnh nhân được tái khẳng định dương tính với melioidosis	2 (5,3%)	1/1	1,160	0,429
2	Bệnh nhân tử vong	9 (23,7%)	5/4	0,631	0,492
3	Bệnh nhân ốm yếu	17 (44,7%)	5/12	0,621	0,556
4	Người khỏe mạnh	10 (26,3%)	1/9	0,661	0,554

Khảo sát đơn thuốc trong thời gian điều trị cho 30 bệnh nhân nội trú và ngoại trú cho thấy 21 bệnh nhân đã được chỉ định dùng kháng sinh, trong đó 15/21 bệnh nhân được dùng cefoperazone/sulbactam. Đặc biệt, chỉ có một bệnh nhân (trong nhóm tử vong) được tiêm tĩnh mạch ceftazidime, là kháng sinh được khuyến cáo để điều trị melioidosis trong giai đoạn tấn công (Sullivan et al., 2020); 9 bệnh nhân còn lại không được sử dụng bất kỳ loại kháng sinh nào trong thời gian điều trị (Phụ lục 3).



Ở nhóm bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis (n=2), 1 bệnh nhân không được chỉ định xét nghiệm nuôi cấy vi sinh trong thời gian nằm viện và 1 bệnh nhân khác âm tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy. Trường hợp đầu tiên là bệnh nhân nam, 47 tuổi, không mắc bệnh tiểu đường. Bệnh nhân nhập viện ngày 13/11 với vết thương ở đùi trái do bị lợn cào khi di chuyển đàn gia súc ra khỏi khu vực bị lũ lụt nghiêm trọng. Bệnh nhân đã được điều trị bằng kháng sinh ampicillin/sulbactam, ofloxacin và tinidazole. Sau 12 ngày nằm viện, bệnh nhân đã được xuất viện. Huyết thanh của bệnh nhân được thu thập khi nhập viện và dương tính với melioidosis bằng cả WC-ELISA và Hcp1-ELISA ( $OD_{490} = 1,674$  và  $0,603$  tương ứng với WC-ELISA và Hcp1-ELISA). Vài ngày sau, bệnh nhân bị sốt cao và nhập viện tại bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương cơ sở 2. Tại đây, bệnh nhân được xét nghiệm nuôi cấy vi sinh và dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei*. Sau hai tuần điều trị tại bệnh viện và hai tháng uống kháng sinh tại nhà, bệnh nhân đã hoàn toàn bình phục.

Trường hợp thứ hai là bệnh nhân nam, 51 tuổi, bị bệnh tiểu đường. Bệnh nhân bị sốt cao và nhập viện ngày 15/11. Hai mẫu máu đều âm tính với *B. pseudomallei* bằng xét nghiệm nuôi cấy vi sinh. Theo kinh nghiệm, bệnh nhân đã được điều trị bằng cefoperazone/sulbactam và metronidazole. Huyết thanh của bệnh nhân được thu khi nhập viện và được xác nhận là dương tính với melioidosis chỉ bằng xét nghiệm WC-ELISA ( $OD_{490} = 0,646$ ). Bệnh nhân xuất viện ngày 23/11. Đến ngày 1/12, bệnh nhân sốt trở lại với nhiều ổ áp-xe da ở chân và được nhập viện BVĐK tỉnh Hà Tĩnh. Xét nghiệm nuôi cấy vi sinh từ bệnh phẩm mủ ổ áp-xe cho kết quả dương tính với *B. pseudomallei*. Huyết thanh của bệnh nhân đã được thu lần hai vào ngày 5/12 và dương tính với melioidosis bằng cả WC-ELISA và Hcp1-ELISA, trong đó giá trị OD tăng lên đáng kể so với huyết thanh thu lần đầu ( $OD_{490} = 1,392$  và  $1,157$  tương ứng với WC-ELISA và Hcp1-ELISA) (Bảng 3.13).

**Bảng 3.13.** Thông tin nhóm bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis

Tuổi/giới tính	Biểu hiện và chẩn đoán	Nuôi cấy vi sinh	WC-ELISA (OD <sub>490</sub> )	Hcp1-ELISA (OD <sub>490</sub> )	Thông tin
47/Nam	Vết thương nhiễm trùng	Không	1,674 ± 0,004	0,603 ± 0,007	Bệnh nhân nằm viện 13 ngày. Sau khi ra viện, bệnh nhân sốt cao và nhập viện tại BV Bệnh nhiệt đới TW và được xét nghiệm nuôi cấy dương tính với <i>B. pseudomallei</i> .
51/Nam	Sốt không rõ nguyên nhân, tiểu đường	Nuôi cấy máu 2 mẫu (-)	0,646 ± 0,029	0,254 ± 0,004	Bệnh nhân nằm viện 9 ngày. Sau khi xuất viện, bệnh nhân sốt trở lại, xuất hiện nhiều ổ áp xe da ở chân. Bệnh nhân đã được tái nhập viện và xét nghiệm nuôi cấy phát hiện được <i>B. pseudomallei</i> từ bệnh phẩm mủ.

Những ghi nhận từ nhóm bệnh nhân được xác nhận lại bằng nuôi cấy nhiễm trùng melioidosis này đã cung cấp bằng chứng về việc bỏ qua xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn (bệnh nhân đầu tiên) và độ nhạy thấp của xét nghiệm nuôi cấy (bệnh nhân thứ hai) là các nguyên nhân góp phần vào việc bỏ sót ca nhiễm melioidosis

Trong nhóm bệnh nhân tử vong (n=9), 6 bệnh nhân có biểu hiện viêm phổi hoặc suy hô hấp, 2 bệnh nhân bị suy thận, và 1 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư gan. Sự thiếu thông tin của các xét nghiệm, đặc biệt là xét nghiệm nuôi cấy vi sinh đã dẫn đến khó khăn trong việc kết luận chính xác nguyên nhân tử vong của nhóm bệnh nhân này (Bảng 3.14). Nhiều nghiên cứu đã công bố viêm phổi là biểu hiện phổ biến nhất của nhiễm trùng melioidosis, và tổn thương phổi ở bệnh nhân melioidosis có thể bị chẩn đoán nhầm là ung thư phổi. Ngoài ra, bệnh thận mạn tính cũng là một yếu tố nguy cơ của bệnh (Phuong 2008, Currie et al. 2010, Wilson et al. 2016, Zaw et al. 2019). Hơn nữa, một số nghiên cứu đã ghi nhận những bệnh nhân nhiễm melioidosis dạng mạn tính có biểu hiện lâm sàng là sức khỏe bị suy giảm, kèm theo các yếu tố nguy cơ và thường bị chẩn đoán bị ung thư (Currie et al., 2003; Nandi and Tan; 2013). Vì vậy, những bệnh nhân dương tính với melioidosis bằng

xét nghiệm ELISA cần được nghiên cứu sâu hơn để tìm ra nguyên nhân tử vong hoặc suy giảm sức khỏe.

**Bảng 3.14.** Thông tin nhóm bệnh nhân tử vong

<b>Tuổi/giới tính</b>	<b>Biểu hiện và chẩn đoán</b>	<b>Nuôi cấy vi sinh</b>	<b>WC-ELISA (OD<sub>490</sub>)</b>	<b>Hcp1-ELISA (OD<sub>490</sub>)</b>	<b>Thông tin</b>
74/Nữ	Mệt mỏi	Không	2,145 ± 0,126	0,330 ± 0,005	Sau khi xuất viện, bệnh nhân nhập viện khác và được chẩn đoán ung thư gan. Bệnh nhân qua đời vào tháng 9/2021.
82/Nữ	Thiếu máu, suy thận	Không	0,631 ± 0,004	0,230 ± 0,015	Sau khi xuất viện, bệnh nhân nhập viện khác điều trị suy thận. Bệnh nhân qua đời vào tháng 4/2021.
74/Nam	Viêm phổi và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính	Không	0,423 ± 0,004	0,531 ± 0,008	Bệnh nhân tử vong sau khi ra viện một tuần.
44/Nam	Xơ gan và suy thận	Không	0,390 ± 0,008	0,526 ± 0,004	Bệnh nhân chuyển nặng và tử vong sau khi ra viện
59/Nam	Viêm phổi, xơ gan, huyết áp cao	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	1,376 ± 0,027	0,171 ± 0,001	Bệnh nhân được chuyển đến một bệnh viện khác ở Hà Nội và được chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi. Tháng 6/2021, bệnh nhân bị viêm phổi nặng tràn dịch màng phổi và tử vong.
43/Nam	Viêm phổi, xơ gan và ung thư gan	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	0,607 ± 0,008	0,492 ± 0,018	Bệnh nhân xuất viện do không đủ điều kiện kinh tế điều trị. Bệnh nhân tử vong tháng 3/2021.
59/Nam	Sốc nhiễm trùng, suy hô hấp và suy thận mạn tính	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	0,802 ± 0,056	0,413 ± 0,002	Sau 10 ngày kể từ ngày ra viện, bệnh nhân tử vong vào tháng 12/2020.
84/Nữ	Viêm phổi và thiếu	Nuôi cấy dịch	0,207 ±	1,211 ±	Sau khi xuất viện, sức khỏe của bệnh nhân tiến triển xấu và tử

	máu	màng phổi (-)	0,000	0,036	vong vào tháng 12/2020.
79/Nữ	Sốt nhiễm trùng và viêm phổi	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-) Nuôi cấy đờm 1 mẫu (-)	0,665 ± 0,018	0,903 ± 0,012	Sau 9 ngày ra viện, sức khỏe của bệnh nhân ngày càng yếu và tử vong vào tháng 2/2021.

Trong nhóm bệnh nhân khỏe mạnh (n=10), có 5 bệnh nhân được điều trị ngoại trú, điều này cho thấy tình trạng bệnh lý nhẹ của nhóm bệnh nhân này tại thời điểm khám chữa tại bệnh viện (Bảng 3.15). Theo nghiên cứu của Trịnh Thành Trung và cs (2018), Hà Tĩnh là khu vực lưu hành melioidosis (Trung et al., 2018), do vậy tỉ lệ lớn người dân có thể phơi nhiễm và tạo kháng thể kháng lại *B. pseudomallei*, và cho phản ứng dương tính với xét nghiệm ELISA trong nghiên cứu này. Trước đó, theo điều tra của Lê Văn Phụng và cs (1993) thì có từ 6,4-31,8% người dân thuộc các vùng dân cư sống ở ngoại thành Hà Nội có huyết thanh dương tính với xét nghiệm IHA (Van Phung et al., 1993). Trên thế giới, nhiều nghiên cứu cũng có ghi nhận tương tự, những người khỏe mạnh sống tại các vùng lưu hành bệnh dịch melioidosis có tỷ lệ huyết thanh dương tính với *B. pseudomallei* cao. Khoảng 40% người trưởng thành khỏe mạnh có xét IHA hiệu giá > 1:80 (Wuthiekanun et al., 2006; Wuthiekanun et al., 2008; Duval et al., 2014; Chaichana et al., 2018; Hantrakun et al., 2018).

**Bảng 3.15.** Thông tin nhóm bệnh nhân khỏe mạnh

Tuổi/giới tính	Biểu hiện và chẩn đoán	Nuôi cấy vi sinh	WC-ELISA (OD <sub>490</sub> )	Hcp1-ELISA (OD <sub>490</sub> )
61/Nam	Viêm phổi và nghi ngờ ung thư phổi	Không	1,001 ± 0,011	0,674 ± 0,002
60/Nam	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính	Không	0,637 ± 0,058	0,172 ± 0,004
75/Nữ	Viêm phổi	Không	0,231 ± 0,000	0,550 ± 0,008
44/Nam	Sốt và đau đầu	Không	1,733 ± 0,035	0,330 ± 0,010

61/Nam	Sốt và đau đầu	Không	0,725 ± 0,058	0,569 ± 0,016
72/Nam	Tiểu đường	Không	0,366 ± 0,008	0,583 ± 0,002
65/Nam	Khó thở	Không	0,281 ± 0,021	0,728 ± 0,001
81/Nữ	Tiểu đường	Không	0,644 ± 0,011	0,318 ± 0,002
89/Nữ	Viêm phổi và tiểu đường	Không	0,717 ± 0,032	0,557 ± 0,007
70/Nữ	Viêm đa khớp	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	0,678 ± 0,048	0,304 ± 0,007

Hạn chế trong nghiên cứu này là mẫu huyết thanh chỉ được thu thập tại một thời điểm duy nhất trong thời gian bệnh nhân tới bệnh viện khám bệnh và điều trị. Điều này gây khó khăn trong việc phân biệt kết quả xét nghiệm huyết thanh dương tính giữa bệnh nhân nhiễm trùng melioidosis thực sự và bệnh nhân có kháng thể nền cao kháng *B. pseudomallei* do họ sống trong vùng lưu hành bệnh dịch melioidosis. Như vậy có thể thấy tầm quan trọng của việc xét nghiệm huyết thanh tại nhiều thời điểm khi giá trị OD ở cả hai xét nghiệm WC-ELISA và Hcp1-ELISA tăng lên đáng kể với mẫu huyết thanh được thu lần thứ hai ở bệnh nhân thứ hai nhiễm melioidosis đã được xác nhận lại bằng nuôi cấy tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh. Tuy nhiên, việc lấy mẫu huyết thanh lần thứ hai từ các bệnh nhân sau khi họ xuất viện là rất khó khăn do khoảng cách địa lý và tình hình bệnh dịch Covid-19 lưu hành tại thời điểm đó.

Nghiên cứu này đã chứng minh WC-ELISA và Hcp1-ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong xét nghiệm nhiễm trùng melioidosis trên đối tượng bệnh nhân người Việt. Xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA là xét nghiệm huyết thanh học đáng tin cậy có thể được sử dụng để phát hiện các ca melioidosis bị bỏ sót do xét nghiệm nuôi cấy vi sinh có độ nhạy thấp hoặc không được chỉ định. Bằng xét nghiệm WC/Hcp1-ELISA, nghiên cứu đã phát hiện ra số lượng nhiều hơn các bệnh nhân có huyết thanh dương tính với melioidosis nhập viện sau các hiện tượng thời tiết khắc nghiệt. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác số ca nhiễm, mỗi bệnh nhân nghi ngờ nhiễm melioidosis cần được xét nghiệm WC/Hcp1-ELISA huyết thanh tại ba

thời điểm là nhập viện, điều trị và tái khám sau xuất viện hai tuần. Đồng thời kết quả WC/Hcp1-ELISA được so sánh với xét nghiệm nuôi cấy và real-time PCR TTSS1. Đây là nghiên cứu cần thiết để khẳng định kỹ thuật xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA đáng tin cậy và cần được triển khai nhằm đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chính xác của xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA trong chẩn đoán bệnh nhân sốt nhập viện, cũng như điều tra số ca nhiễm melioidosis thực sự ghi nhận hàng năm ở Việt Nam.

### 3.2. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT PHÁT HIỆN *B. pseudomallei* NGOÀI MÔI TRƯỜNG

#### 3.2.1. Nghiên cứu phát triển kỹ thuật nuôi cấy phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường

##### 3.2.1.1. Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy làm giàu bằng real-time PCR TTSS1

DNA được tách chiết từ 640 dịch nuôi cấy làm giàu và phân tích bằng xét nghiệm real-time PCR TTSS1 đặc hiệu vi khuẩn *B. pseudomallei*. Kết quả cho thấy có tổng số 282/640 mẫu dịch làm giàu dương tính với *B. pseudomallei*. Đối với từng mẫu đất, có 51/80 (63,8%) mẫu đất dương tính ở ít nhất một trong tám dịch làm giàu, 29/80 (36,2%) mẫu đất âm tính hoàn toàn ở cả tám loại dịch làm giàu.

Với kỹ thuật làm giàu một bước, giá trị  $C_T$  trung bình của các dịch làm giàu TBSS-C50 144 giờ ( $C_T$  27,49) và EM 144 giờ ( $C_T$  30,46) thấp hơn đáng kể so với giá trị  $C_T$  trung bình của các dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ (32,55) và EM 48 giờ (33,48), và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, tỷ lệ mẫu dương tính với real-time PCR ở dịch làm giàu 144 giờ là nhiều hơn so với dịch làm giàu 48 giờ. Cụ thể, với thời gian làm giàu 48 giờ trên môi trường TBSS-C50 hoặc EM, chỉ có 27,5% (22/80) mẫu đất dương tính, trong khi đó thời gian ủ 144 giờ trên TBSS-C50 cho 38,75% (31/80) mẫu dương tính, 144 giờ trên EM cho 45% (36/80) mẫu dương tính. Như vậy, hai loại môi trường TBSS-C50 và EM với cùng một thời gian ủ không có sự khác nhau đáng kể về tỷ lệ mẫu dương tính (Bảng 3.16, Hình 3.6).

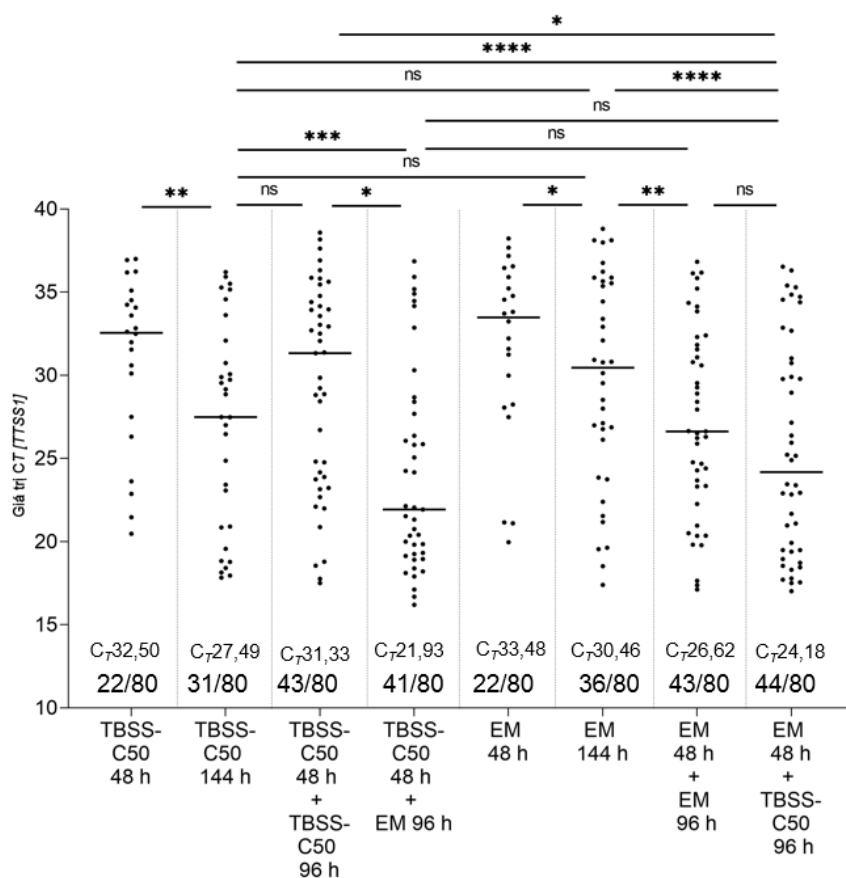
**Bảng 3.16.** Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu 1 bước được đánh giá bằng qPCR TTSS1

	<b>Dịch làm giàu</b>			
	TBSS-C50 48 giờ	EM 48 giờ	TBSS-C50 144 giờ	EM 144 giờ
$C_T$ trung bình	32,55	33,48	27,49	30,46
Số dịch làm giàu dương tính (%)	22/80 (27,5%)	22/80 (27,5%)	31/80 (38,75%)	36/80 (45%)

Với kỹ thuật làm giàu hai bước, dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ ( $C_T$  21,93) hoặc EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ ( $C_T$  24,18) có tải lượng *B. pseudomallei* cao vượt trội thể hiện qua giá trị  $C_T$  trung bình thấp hơn đáng kể so với dịch làm giàu một bước TBSS-C50 144 giờ ( $C_T$  27,49) và EM 144 giờ ( $C_T$  30,46). Tỷ lệ mẫu dương tính ở dịch làm giàu trên 2 loại môi trường kết hợp khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, 51,3% (41/80) mẫu đất dương tính ở dịch làm giàu TBSS-50 48 giờ + EM 96 giờ so với 55% (44/80) mẫu dương tính ở EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ. Đồng thời, tải lượng *B. pseudomallei* trên hai loại dịch làm giàu này cũng không khác biệt với giá trị  $C_T$  trung bình lần lượt là 21,93 (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) và 24,18 (EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ) ( $C_T$  21,93 và  $C_T$  24,18,  $p > 0,5$ ). Cùng là kỹ thuật làm giàu hai bước nhưng dịch làm giàu đơn môi trường TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ ( $C_T$  31,33) cho tải lượng vi khuẩn thấp hơn so với dịch làm giàu kết hợp TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ hoặc EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ ( $C_T$  21,93 và  $C_T$  24,18,  $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu đất dương tính ở dịch làm giàu hai bước trên môi trường đơn hoặc kết hợp là không có sự khác biệt. Trong khi đó, dịch làm giàu hai bước đơn môi trường EM 48 giờ + EM 96 giờ ( $C_T$  26,62) có tải lượng vi khuẩn và tỉ lệ mẫu dương tính không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với dịch làm giàu hai bước trên môi trường kết hợp (Bảng 3.17, Hình 3.6).

**Bảng 3.17.** Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu 2 bước được đánh giá bằng q PCR TTSS1

	<b>Dịch làm giàu</b>			
	TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ	EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ	TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ	EM 48 giờ + EM 96 giờ
$C_T$ trung bình	21,93	24,18	31,33	26,62
Số dịch làm giàu dương tính (%)	41/80 (51,3%)	44/80 (55%)	43/80 (53,75%)	43/80 (53,75%)



**Hình 3.6.** Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* từ 80 mẫu đất được đánh giá bằng qPCR TTSS1. Mẫu dương tính với qPCR TTSS1 trình bày dưới dạng dấu chấm với giá trị  $C_T$  tương ứng trên trục hoành. Friedman test được sử dụng để phân tích  $C_T$  khác nhau có ý nghĩa. Phân tích sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị  $C_T$  của dịch làm giàu bằng hàm Friedman's test với giá trị  $C_T$  lớn hơn 39,0 dịch làm giàu được xem là âm tính với qPCR (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.2.1.2. Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy làm giàu bằng phân lập *B. pseudomallei*

Bên cạnh đánh giá sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng phương pháp real-time PCR, phân lập vi khuẩn được thực hiện để (i) khẳng định mẫu dương tính, (ii) điều tra dịch tễ và (iii) đánh giá độc lực chủng vi khuẩn. Phân lập vi khuẩn *B. pseudomallei* được thực hiện với 408 dịch làm giàu của 51 mẫu đất dương tính từ xét nghiệm real-time PCR TTSS1 ở trên. Lượng mẫu 100  $\mu\text{L}$  được cấy trải trên đĩa thạch Ashdown, ủ tại 40°C trong 7 ngày. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập được vi

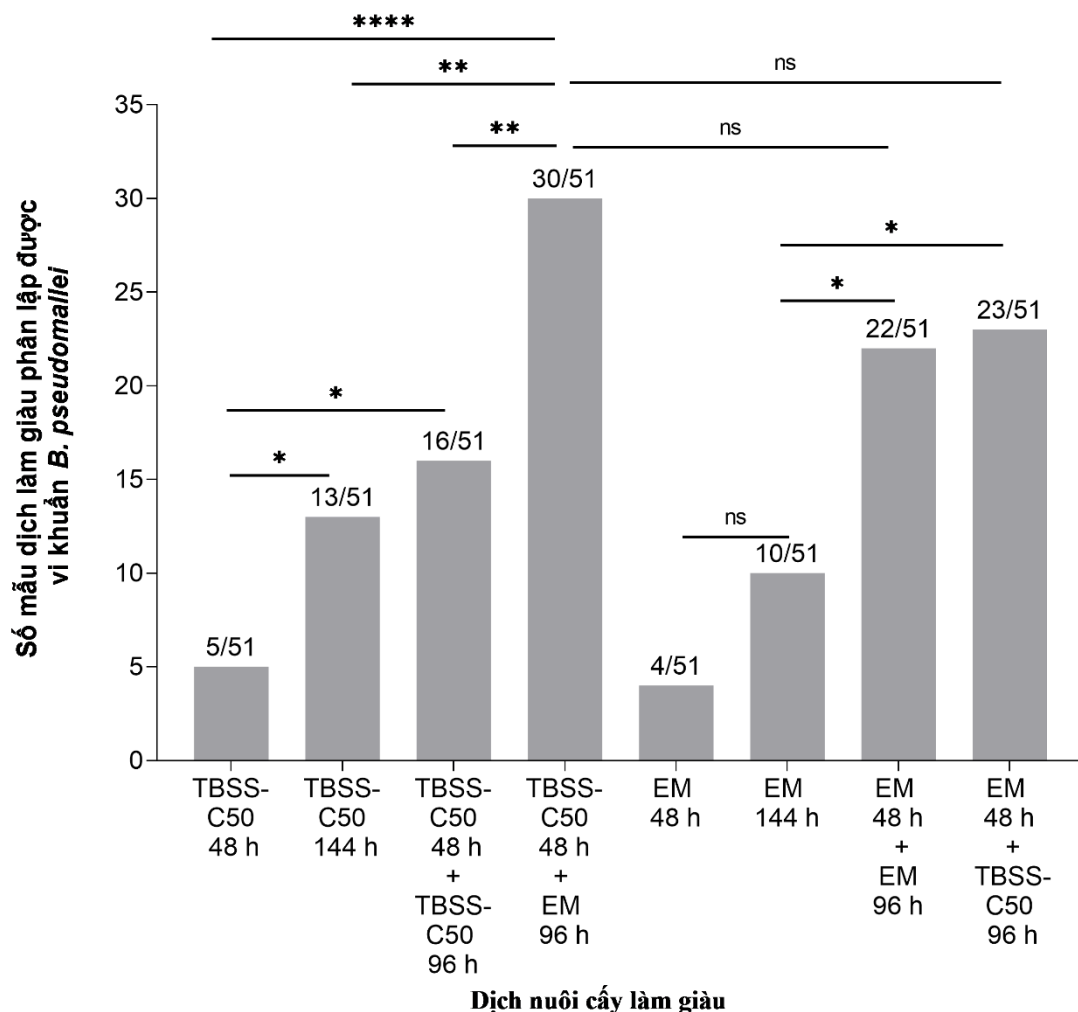


khuẩn *B. pseudomallei* từ dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ (30/51; 58%) cao hơn so với các dịch làm giàu còn lại (Bảng 3.18, Hình 3.7).

**Bảng 3.18.** Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy làm giàu được đánh giá bằng kỹ thuật nuôi cấy phân lập

TT	Loại dịch làm giàu	Số lượng dịch làm giàu phân lập được vi khuẩn <i>B. pseudomallei</i> (%)
1	TBSS-C50 48 giờ	5/51 (9,8%)
2	TBSS-C50 144 giờ	13/51 (25,5%)
3	TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ	16/51 (31,4%);
4	<b>TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ</b>	<b>30/51 (58%)</b>
5	EM 48 giờ	4/51 (7,8%)
6	EM 144 giờ	10/51 (19,6%)
7	EM 48 giờ + EM 96 giờ	22/51 (43,1%)
8	EM 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ	23/51 (45,1%)

Khi đánh giá trên từng mẫu đất ở cả 8 loại dịch làm giàu, có 34/51 (66,66%) mẫu đất nuôi cấy được vi khuẩn *B. pseudomallei* trên đĩa thạch Ashdown. Trong đó, 17/34 (50%) mẫu đất phân lập được vi khuẩn chỉ trên dịch làm giàu EM mà không có trên dịch làm giàu TBSS-C50. Trong 17 mẫu đất này, có 7 mẫu đất chỉ dương tính ở dịch làm giàu TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ; 1 mẫu đất chỉ dương tính ở dịch làm giàu EM 48 giờ + TBSS-50 96 giờ; 2 mẫu đất chỉ dương tính ở dịch làm giàu EM 48 giờ + EM 96 giờ; và 1 mẫu đất chỉ dương tính ở dịch làm giàu EM 144 giờ. Không có mẫu đất nào dương tính ở dịch làm giàu TBSS-C50 mà lại âm tính ở dịch làm giàu EM.



**Hình 3.7.** Hiệu quả của kỹ thuật làm giàu vi khuẩn *B. pseudomallei* từ 80 mẫu đất được đánh giá bằng phân lập trên thạch Ashdown. Fisher's test được sử dụng để phân tích sự khác nhau về số lượng mẫu dương tính có ý nghĩa (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước trên cùng một loại môi trường (TBSS-C50 48 giờ + TBSS-C50 96 giờ) cho số mẫu phân lập được vi khuẩn *B. pseudomallei* (16/51) bằng khoảng 50% so với làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) (30/51). Kết quả này cho thấy tính chọn lọc cao của môi trường EM và có tiềm năng trong việc làm giảm đáng kể tỷ lệ nuôi cấy âm tính giả khi áp dụng phương pháp nuôi cấy theo hướng dẫn chuẩn sử dụng TBSS-C50 48 giờ (5/51). Sau khi c Tuy nhiên, ngay cả khi tỷ lệ nuôi cấy âm được cải thiện thì vẫn còn gần 40% số mẫu dương tính với real-time PCR TTSS1 nhưng âm tính với nuôi cấy, điều này cho thấy khoảng cách lớn giữa hai kỹ thuật này trong điều tra *B.*

*pseudomallei* ngoài môi trường. Ngược lại, một nghiên cứu trước đây đã báo cáo 1 mẫu môi trường âm tính với nuôi cấy làm giàu và real-time PCR TTSS1 nhưng lại dương tính với kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp thông thường (Dance et al. 2018). Do vậy, các mẫu âm tính với real-time PCR TTSS1 trong nội dung nghiên cứu của luận án này có thực sự âm tính với nuôi cấy hay không cũng cần được thực hiện nghiên cứu đánh giá trong thời gian tới.

Như vậy, cả kỹ thuật làm giàu (một bước và hai bước) và môi trường làm giàu (TBSS-C50 và EM) có ảnh hưởng đến hiệu quả phát hiện *B. pseudomallei* trong các mẫu đất ruộng, tóm tắt như sau:

- Nuôi cấy làm giàu một bước trên TBSS-C50 hoặc EM trong 144 giờ làm tăng khả năng sinh trưởng của *B. pseudomallei* và tăng số mẫu dương tính bằng real-time PCR TTSS1 so với nuôi cấy làm giàu trên TBSS-C50 48 giờ theo hướng dẫn chuẩn.

- Nuôi cấy làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) giúp cho *B. pseudomallei* sinh trưởng mạnh mẽ nhất và cho số mẫu phân lập được vi khuẩn cao gấp 6 lần so với hướng dẫn chuẩn TBSS-C50 48 giờ.

Kết quả khả quan của kỹ thuật làm giàu hai bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ có thể do nguồn carbon từ đất có trong dịch làm giàu bước một được pha loãng khi chuyển sang môi trường làm giàu bước hai, khiến cho phần lớn các loài vi khuẩn khác không thể sinh trưởng với nguồn carbon erythritol duy nhất có trong EM, do đó làm tăng tính chọn lọc của EM với vi khuẩn *B. pseudomallei*.

Từ kết quả của nghiên cứu, kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ đã được lựa chọn và thử nghiệm ứng dụng trong điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất và nước tại huyện Triệu Sơn, Thanh Hóa và huyện Sóc Sơn, Hà Nội.

### **3.2.2. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước trong điều tra sự có mặt của *B. pseudomallei* ngoài môi trường**

#### *3.2.2.1. Điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa tại huyện Triệu Sơn-tỉnh Thanh Hóa*

##### a. Sự biến động về tần suất bắt gặp và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei*

Theo dữ liệu điều tra của TS. Trịnh Thành Trung và cs (kết quả của nhiệm vụ RENOMAB), trong thời gian từ tháng 01/2015-12/2017, ca nhiễm melioidosis ở Việt Nam thường được phát hiện nhiều từ tháng 7 đến tháng 11 hàng năm (Phụ lục 4). Nguyên nhân của hiện tượng trên có thể do có nhiều yếu tố nguy cơ nhiễm trùng vi khuẩn *B. pseudomallei* xuất hiện vào khoảng thời gian này trong năm, đặc biệt là nhiệt độ, lượng mưa và hoạt động canh tác lúa. Theo báo cáo của Tổng cục thống kê Việt Nam, nhiệt độ trung bình tháng có xu hướng tăng bắt đầu từ tháng 4 và giảm dần sau tháng 10, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của nhiều nhóm vi sinh vật trong đó có vi khuẩn *B. pseudomallei*. Ngoài ra, đây cũng là khoảng thời gian ghi nhận lượng mưa trung bình lớn ở Việt Nam, cùng với đó là nhiều hiện tượng thời tiết bất thường như giông bão và lốc có thể cuốn theo các hạt bụi đất hoặc khí dung chứa *B. pseudomallei* mà con người có thể hít phải (Phụ lục 5). Đồng thời, nhiều hoạt động canh tác nông nghiệp cũng diễn ra trong khoảng thời gian này, dẫn đến nguy cơ người dân tiếp xúc với đất và nước chứa vi khuẩn tăng cao.

Tiến trình lây nhiễm bệnh thành công thường gồm các yếu tố như liều lượng tác nhân gây nhiễm, con đường lây nhiễm, trạng thái sức khỏe, môi trường sống của vật chủ, và độc lực của tác nhân nhiễm trùng (Van Seventer and Hochberg, 2017). Giả thuyết được đưa ra là vào thời gian này trong năm, tần suất bắt gặp và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường cao hơn những tháng còn lại. Thực tế trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu công bố vi khuẩn *B. pseudomallei* trong đất, đất trồng lúa, và nước sông có tần suất bắt gặp và mật độ cao hơn vào mùa mưa so với mùa khô (Manivanh et al., 2017; Ong et al., 2017; Zimmermann et al., 2018). Tuy nhiên, sự hiện diện của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa mới chỉ được nghiên cứu vào một thời điểm là mùa mưa, dẫn đến thiếu cơ sở khoa học để đánh giá sự biến động theo mùa của vi khuẩn trong môi trường nước ruộng lúa

(Vongphayloth et al., 2012; Ong et al.; 2017). Trong nghiên cứu này, điều tra về tần suất bắt gặp và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa theo các tháng trong năm đã được tiến hành một cách chi tiết hơn.

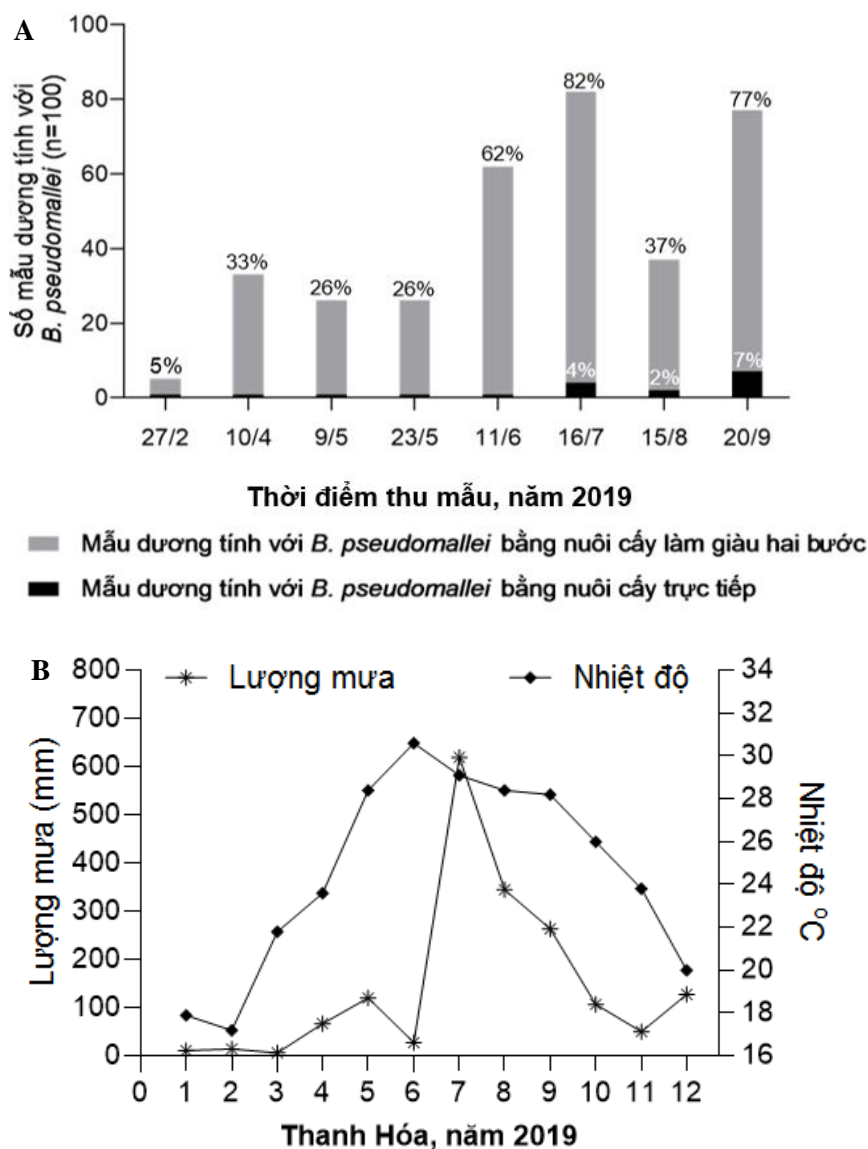
Dữ liệu điều tra môi trường thuộc Đề tài RENOMAB (Trịnh Thành Trung và cs, 2014-2017) cho thấy mẫu đất ruộng lúa tại xã Xuân Lộc, huyện Triệu Sơn, tỉnh Thanh Hóa (19°83'85,5"N, 105°62'3,8"E) có sự tồn tại của vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng kỹ thuật nuôi cấy phân lập. Vì vậy, năm 2019, vị trí ruộng lúa này được lựa chọn để điều tra sự biến động theo mùa của tần suất bắt gặp và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa. Mẫu nước ruộng lúa được thu vào 8 thời điểm khác nhau từ tháng 2 đến tháng 9/2019, trùng với thời điểm hai vụ canh tác lúa: vụ xuân hè và vụ hè thu. Các hoạt động mùa vụ chủ yếu gồm làm đất (cày và bừa), cấy lúa, chăm sóc (làm cỏ, bón phân và phòng trừ sâu bệnh) và thu hoạch (Phụ lục 6).

Tổng cộng 800 mẫu nước (thu 100 mẫu/lần, trong 8 lần) được phân tích bằng kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp trên đĩa thạch Ashdown và kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ. Với kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước, dịch nuôi cấy sau khi làm giàu được tách chiết DNA cho real-time PCR TTSS1. Đồng thời, 100 uL với dịch làm giàu dương tính với real-time PCR được trang lên đĩa thạch Ashdown để phân lập vi khuẩn *B. pseudomallei*. Kết quả của kỹ thuật làm giàu hai bước cho thấy tần suất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa biến động lớn giữa các thời điểm thu mẫu. Số mẫu dương tính tăng khi nền nhiệt độ tại khu vực lấy mẫu tăng. Tổng số mẫu nước dương tính với *B. pseudomallei* thu từ tháng 6 đến tháng 9 là 258/400 (64,5%), cao gấp gần 3 lần so với tổng số mẫu dương tính thu từ tháng 2 đến tháng 5 (90/400, 22,5%). Đồng thời, nhiệt độ môi trường trung bình tại tỉnh Thanh Hóa từ tháng 6-9 là 29,1°C cao hơn đáng kể so với nhiệt độ trung bình của tháng 2-5 là 22,75°C. Điều này cho thấy nhiệt độ môi trường có thể có mối tương quan với tần suất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa. Trong khi đó, lượng mưa trung bình tại khu vực lấy mẫu không thể hiện mối liên hệ với tần suất bắt gặp *B. pseudomallei* (Hình 3.8).

Bên cạnh đó, tại thời điểm thu mẫu 15/8, mặc dù nền nhiệt môi trường cao (28,4°C) nhưng vi khuẩn *B. pseudomallei* chỉ có mặt ở 37/100 mẫu nước, bằng khoảng 50% so với các lần thu mẫu trước và sau đó. Hiện tượng này có thể được giải thích là do mẫu nước được thu ngay sau khi xảy ra một trận mưa rào lớn, dẫn đến nồng độ vi khuẩn trong nước ruộng lúa ở nhiều điểm thu mẫu bị pha loãng đến dưới ngưỡng mà phương pháp nuôi cấy làm giàu có thể phát hiện được. Sau đó khoảng một tháng (20/9), số mẫu nước dương tính với *B. pseudomallei* lại tăng lên tương đương với thời điểm lấy mẫu trước đó một tháng (16/7). Như vậy, mặc dù vi khuẩn *B. pseudomallei* không được phát hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu nhưng vẫn có thể tồn tại trong nước ở mật độ thấp và tiếp tục sinh trưởng trong điều kiện môi trường thuận lợi như nhiệt độ môi trường ẩm áp, hàm lượng chất dinh dưỡng trong nước phù hợp, môi trường ruộng lúa không bị tác động bởi hoạt động canh tác (ruộng được nghỉ sau vụ gặt, không bón phân, không sử dụng thuốc trừ sâu, diệt cỏ,..) v.v... Theo nghiên cứu trước đây, vi khuẩn *B. pseudomallei* có khả năng sinh trưởng tăng mật độ từ  $10^6$  lên  $10^8$  CFU/mL trong môi trường nước cất trong thời gian một tháng với điều kiện nhiệt độ thích hợp  $>24^\circ\text{C}$  và  $<40^\circ\text{C}$  (Wuthiekanun et al., 1995; Tong et al., 1996). Ngoài ra, hiện tượng này cũng có thể được giải thích do sau khi vi khuẩn *B. pseudomallei* trong nước ruộng lúa đột ngột bị lượng lớn nước mưa cuốn đi, thì vi khuẩn trong lớp bùn đất đã di chuyển lên lớp nước phía trên và tiếp tục tăng sinh mật độ trong điều kiện thích hợp như trên. Nhiều nghiên cứu trước đây đã công bố hiện tượng vi khuẩn *B. pseudomallei* di chuyển từ lớp đất sâu lên lớp đất bề mặt vào mùa mưa (Thomas et al., 1979; Wuthiekanun et al., 1995; Vuddhakul., 1999; Wuthiekanun et al., 2005).

Với kỹ thuật làm giàu hai bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ, thông qua đánh giá bằng kỹ thuật real-time PCR TTSS1 và phương pháp phân lập trên thạch Ashdown, lần lượt có 348/800 (43,5%) và 327/800 (40,9%) dịch làm giàu dương tính với *B. pseudomallei*. Các dịch làm giàu có tải lượng vi khuẩn *B. pseudomallei* cao thể hiện qua giá trị  $C_T$  trung bình khá thấp (từ 17,33 - 25,91), giải thích cho tỉ lệ lớn các dịch làm giàu phân lập được chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* (từ 80,52-100%) (Bảng 3.19). Trong khi đó, kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp chỉ phân lập được vi

khuẩn *B. pseudomallei* từ 13/800 (1,6%) mẫu nước ruộng lúa. Đáng chú ý là kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp chỉ phát hiện được vi khuẩn *B. pseudomallei* ở các tháng 7, 8 và 9 với số mẫu dương tính lần lượt là 4, 2 và 7/100 và mật độ trung bình tương ứng là 35; 13 và 151 CFU/mL (Hình 3.8, Bảng 3.19). Điều này cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng không chỉ đến tần suất bắt gặp mà còn đến mật độ vi khuẩn.



**Hình 3.8.** (A) Số mẫu nước dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei* ở 8 thời điểm lấy mẫu bằng 2 kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp và làm giàu hai bước; (B) Nhiệt độ và lượng mưa trung bình tháng tại tỉnh Thanh Hóa năm 2019.

Cùng với tần suất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* tăng dần ở các tháng có nhiệt độ môi trường tăng cao, vi sinh vật tổng số xuất hiện trong các mẫu nước

ruộng lúa cũng tăng lên cả về số lượng mẫu và mật độ khi phân lập trên môi trường Ashdown (Bảng 3.19). Các nghiên cứu trước đây đã công bố các loài *Burkholderia* khác như *B. thailandensis*, *B. ubonensis* cũng chiếm ưu thế khi phân lập trên môi trường Ashdown (Chandler et al., 1998; Price et al., 2013). Bên cạnh đó, các loài thuộc các chi *Delftia*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, và *Ralstonia* cũng thường xuất hiện khi phân lập mẫu môi trường trên môi trường này (Hall et al., 2015).

**Bảng 3.19.** Tần suất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* và VSV tổng số trong nước ruộng lúa tại 8 thời điểm từ tháng 2-9/2019

Thời điểm thu mẫu	Nuôi cấy trực tiếp <i>B. pseudomallei</i>		Nuôi cấy làm giàu <i>B. pseudomallei</i>		Vi sinh vật tổng số	
	Số mẫu dương tính	Mật độ trung bình (khoảng) (CFU/mL)	Giá trị $C_T$ trung bình	Dương tính với phân lập/real-time PCR TTSS1 (%)	Số mẫu dương tính	Mật độ trung bình (khoảng) (CFU/mL)
27/2/2019	-	-	17,33	5/5 (100%)	-	-
10/4/2019	-	-	25,91	33/33 (100%)	15	87 (10-665)
9/5/2019	-	-	23,83	26/26 (100%)	11	7 (2,5-52,5)
23/5/2019	-	-	19,71	25/26 (96,15%)	7	76 (2,5-482,5)
11/6/2019	-	-	20,34	62/62 (100%)	62	169 (2,5-225)
16/7/2019	4	35 (5-95)	21,11	82/82 (100%)	76	273 (5-4.020)
15/8/2019	2	13 (1-25)	19,16	32/37 (86,48%)	35	221 (5-2.915)
20/9/2019	7	151 (5-750)	21,69	62/77 (80,52%)	55	473 (15-2.522)
<b>Tổng số mẫu dương</b>	Dương tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng nuôi cấy trực tiếp: 13/800 (1,63%)		Dương tính với <i>B. pseudomallei</i> bằng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu 2 bước: + Đánh giá bằng qPCR TTSS1: 348/800 (45,5%) + Đánh giá bằng nuôi cấy trên Ashdown: 327/800 (40,9%)			



b. Đánh giá tính đa dạng của các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phân lập được từ nước ruộng lúa

Từ mỗi mẫu dương tính, 1 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* được phân lập ngẫu nhiên và được bảo quản ở  $-70^{\circ}\text{C}$  cho nghiên cứu tiếp theo. Tổng số 20 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei*, gồm 13 chủng được phân lập trực tiếp từ mẫu nước, 6 chủng được phân lập từ dịch nuôi cấy làm giàu và 1 chủng TS 108.3 được phân lập từ đất ruộng lúa vào năm 2015 được xác định kiểu trình tự MLST để đánh giá tính đa dạng. Trong đó, 6 chủng phân lập từ dịch làm giàu được lựa chọn theo tiêu chí: cùng vị trí lấy mẫu nhưng khác thời điểm thu mẫu; cùng thời điểm thu mẫu nhưng vị trí xa nhau; cùng thời điểm thu mẫu nhưng vị trí gần nhau.

Kết quả phân tích MLST cho thấy 20 chủng thuộc 5 ST gồm ST541 (1 chủng), ST543 (2 chủng), ST533 (3 chủng), ST542 (5 chủng) và ST mới (9 chủng). Trình tự 7 house-keeping gene của ST mới được công bố trên cơ sở dữ liệu MLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>) và được xác nhận mặc dù các allen không mới nhưng các allen này tạo nên tổ hợp kiểu trình tự mới được đặt tên là ST1994 (Bảng 3.20). ST 543 là kiểu trình tự của chủng *B. pseudomallei* TS108.3 phân lập từ đất ruộng vào năm 2015 cũng được bắt gặp trong nước ruộng lúa ở vị trí 36P. Tại cùng một thời điểm lấy mẫu, các vị trí mẫu gần nhau có xu hướng xuất hiện các ST giống nhau (ST542 có mặt có vị trí 26P, 27P, 27T, 28P và 28T; ST1994 ở vị trí 35P, 36P, 37P và 39P); và các điểm xa nhau thường gặp các ST khác nhau (ST 533 ở 8P, ST1994 ở 39P). Tại vị trí 36P, ST1994 xuất hiện ở các tháng 2, 4, 5 (từ dịch làm giàu) và tháng 7 (từ mẫu nước); ST543 và ST533 xuất hiện lần lượt ở tháng 8 và 9 từ dịch làm giàu. Kết quả này cho thấy sự hiện diện các ST có thể không có tính đặc trưng theo mùa và không cạnh tranh ngoài môi trường tự nhiên. Mặc dù mỗi mẫu chỉ được phân lập ngẫu nhiên 1 chủng, và chỉ có 20 chủng được lựa chọn cho phân tích MLST, nhưng kết quả đã cho thấy sự đa dạng của các dòng vi khuẩn *B. pseudomallei* lưu hành trong nước ruộng lúa ở một khu vực lấy mẫu hẹp (Phụ lục 7, 8).

Ngoài ra, theo công bố trước đây, mặc dù ST46 là ST phổ biến ở Việt Nam (Phuong et al., 2008) nhưng không bắt gặp trong nghiên cứu này. Trên cơ sở dữ liệu

MLST, có 6 (4,58%) chủng *B. pseudomallei* thuộc ST 46 trong tổng số 131 chủng từ Việt Nam được phân tích MLST. Do vậy, với số mẫu nhỏ 20 chủng được phân tích MLST thì khả năng bắt gặp ST 46 trong nghiên cứu này là dưới 1 chủng.

**Bảng 3.20.** Đa hình trình tự các kiểu gen MLST của các chủng *B. pseudomallei* đại diện phân lập từ nước ruộng lúa tại Triệu Sơn - Thanh Hóa

STT	Thời gian lấy mẫu	Vị trí lấy mẫu	Ký hiệu chủng	Phương pháp phân lập	Sequence type (ST)
1	2015		TS108.3	Làm giàu	ST543
2	27/2/2019	3T	2TS 3T.1	Làm giàu	ST541
3	27/2/2019	36P	2TS 36P.1	Làm giàu	ST1994 (mới)
4	10/4/2019	36P	4TS 36P.1	Làm giàu	ST1994 (mới)
5	23/5/2019	36P	5TS*36P	Làm giàu	ST1994 (mới)
6	15/8/2019	36P	8TS 36P	Làm giàu	ST543
7	20/9/2019	36P	9TS 36P	Làm giàu	ST533
8	16/7/2019	29P	7TS 29P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
9	16/7/2019	35P	7TS 35P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
10	16/7/2019	36P	7TS 36P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
11	16/7/2019	37P	7TS 37P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
12	15/8/2019	39P	8TS 39P (T)	Trực tiếp	ST533
13	15/8/2019	8P	8TS 8P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
14	20/9/2019	19P	9TS 19P (T)	Trực tiếp	ST1994 (mới)
15	20/9/2019	26P	9TS 26P (T)	Trực tiếp	ST542
16	20/9/2019	27P	9TS 27P (T)	Trực tiếp	ST542
17	20/9/2019	27T	9TS 27T (T)	Trực tiếp	ST542
18	20/9/2019	28P	9TS 28P (T)	Trực tiếp	ST533
19	20/9/2019	28T	9TS 28T (T)	Trực tiếp	ST542
20	20/9/2019	9T	9TS 9T (T)	Trực tiếp	ST542

Tần suất bắt gặp *B. pseudomallei* cao ở mùa mưa được giải thích là do vi khuẩn nằm sâu trong đất - nơi có độ ẩm thích hợp và di chuyển lên trên lớp đất/nước bề mặt vào mùa mưa (Thomas et al., 1979; Wuthiekanun et al., 1995; Manivanh et al., 2017). Một nghiên cứu về sự có mặt của *B. pseudomallei* trong đất và nước ruộng lúa ở Thái Lan đã báo cáo 60% mẫu nước ruộng lúa dương tính với

vi khuẩn vào mùa mưa (tháng 8) với mật độ trung bình 200 CFU/mL (Ong et al., 2017). Tương tự, Vongphayloth và cs (2012) cũng ghi nhận 38% mẫu nước ruộng dương tính với *B. pseudomallei* vào mùa mưa tại Lào (Vongphayloth et al., 2012). Trong một nghiên cứu khác, Zimmermann và cs (2018) đã cho thấy tần suất bắt gặp *B. pseudomallei* trong nước sông vào mùa mưa (57%) cao hơn rất nhiều so với mùa khô (9%). Tuy nhiên, nghiên cứu này đã không đánh giá mức độ đa dạng của các chủng phân lập được giữa hai thời điểm lấy mẫu (Zimmermann et al., 2018). Nhiệt độ môi trường tăng cao vào các tháng mùa mưa có thể kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường. Một giả định khác được đưa ra là có thể một số nhóm vi khuẩn *B. pseudomallei* thích nghi với điều kiện nhiệt độ thấp bị thay thế bởi nhóm thích nghi với nhiệt độ cao vào mùa hè. Tuy nhiên, để kiểm tra giả định này, nghiên cứu cần thực hiện phân lập tất cả các chủng xuất hiện trên môi trường đĩa thạch, phân tích MLST và đánh giá đặc điểm sinh trưởng của tất cả các chủng phân lập được.

Một số nghiên cứu về đa dạng *B. pseudomallei* trong khu vực lấy mẫu hẹp đã cho thấy sự đa dạng của loài vi khuẩn này với nhiều ST khác nhau. Khi đánh giá sự đa dạng của *B. pseudomallei* trong 100 mẫu đất lấy tại khu đất nông nghiệp bị bỏ hoang nhiều năm có diện tích 23,75 x 610 m, Chantratita và cs (2008) đã phát hiện 80/100 mẫu đất dương tính với *B. pseudomallei* trong đó có 77/100 mẫu dương tính theo cả hai kỹ thuật nuôi cấy trực tiếp và nuôi cấy làm giàu một bước trên TBSS-C50. Trong nghiên cứu này, 3 điểm cách nhau từ 7,6-13,3 m được chọn để đánh giá sự đa dạng quần thể *B. pseudomallei*. Tại mỗi điểm, 200 chủng được phân lập. Kết quả phân tích MLST cho thấy có 9 ST, 12 mô hình băng PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) xuất hiện ở 3 điểm này. Trong đó, chỉ có 2 ST xuất hiện ở tối đa 2 điểm, không có ST nào xuất hiện ở cả 3 điểm. Tác giả cho rằng đã có sự tiến hóa của *B. pseudomallei* trong phạm vi môi trường sinh sống hẹp (Chantratita et al., 2008).

Sau đó, Wuthiekanun và cs (2009) cũng đánh giá đa dạng *B. pseudomallei* trên đất nông nghiệp đang được canh tác với các hoạt động cày cấy và chăn thả gia súc và đã phát hiện 28/100 mẫu dương tính với *B. pseudomallei* bằng nuôi cấy trực

tiếp, nuôi cấy làm giàu không phát hiện thêm mẫu dương tính. Tổng số 630 chủng *B. pseudomallei* được phân lập từ 11 điểm, được xếp vào 7 ST và 10 mô hình băng PFGE, có 9/11 điểm chứa 1 ST, 1 điểm chứa 2 ST và 1 điểm chứa 3 ST. Trong đó, ST54 phân bố rộng khắp khu vực lấy mẫu, hai ST56 và ST518 có mặt ở 2 vị trí lấy mẫu bên cạnh nhau. Điều này cho thấy mức độ đa dạng của các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* vẫn tương đối cao mặc dù có các hoạt động canh tác nông nghiệp diễn ra. Chính vì vậy người nông dân có nguy cơ tiếp xúc cùng một lúc với nhiều ST khác nhau trong mỗi lần tham gia hoạt động canh tác nông nghiệp, và có thể dẫn đến khả năng phơi nhiễm với chủng có độc lực cao (Wuthiekanun et al., 2009). Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng phát hiện chỉ có 28% mẫu đất nông nghiệp đang canh tác dương tính với *B. pseudomallei*, thấp hơn nhiều so với 80% mẫu dương tính trong đất nông nghiệp bị bỏ hoang ở nghiên cứu của Chantratita và cs (2008) (Chantratita et al., 2008, Wuthiekanun et al., 2009). Ngoài ra, số ST bắt gặp ở đất nông nghiệp bỏ hoang cũng nhiều hơn so với ở đất nông nghiệp đang canh tác (9 ST/600 chủng/3 điểm so với 7 ST/630 chủng/11 điểm). Kết quả này có thể được giải thích là do phân bón và các chất hóa học được sử dụng trong quá trình canh tác có thể làm giảm mức độ đa dạng của *B. pseudomallei* (Wuthiekanun et al., 2009).

Một nghiên cứu khác đã đánh giá độc lực của các chủng *B. pseudomallei* thuộc các ST khác nhau phân lập từ cùng một vị trí. Tổng số 288 chủng *B. pseudomallei* được phân lập từ cùng một lỗ khoan, 169 chủng trong số này được phân tích đa dạng di truyền và được xếp vào 7 ST, trong đó có 1 ST mới. Đánh giá độc lực trên chuột cho thấy các chủng thuộc ST58 (n=6) và ST176 (n=1) có độc lực cao gây chết 100% chuột; trong khi tất cả các chủng thuộc ST93 (n=10) không gây chết chuột; chỉ có 1/8 chủng thuộc ST1005 và 1/5 chủng thuộc ST60 (n=4) làm chết toàn bộ chuột thí nghiệm (Roe et al., 2022). Các kết quả này đã cho thấy các chủng có mức độ đa dạng cao cũng như độc lực khác nhau phụ thuộc ST, thậm chí có sự khác biệt giữa các chủng trong cùng ST ở cùng một vị trí lấy mẫu. Như vậy có nguy cơ cao con người tiếp xúc cùng một lúc với nhiều chủng *B. pseudomallei* có độc lực khác nhau.

3.2.2.2. Điều tra sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường tại huyện Sóc Sơn-Tp. Hà Nội

Tháng 11/2019, Trung tâm Y tế Sóc Sơn báo cáo về ba trường hợp trẻ em tử vong trong cùng một gia đình tại thôn Đô Lương, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn, thành phố Hà Nội do nhiễm khuẩn *B. pseudomallei* trong vòng 8 tháng.

- Ca bệnh đầu tiên là bé gái 7 tuổi xuất hiện triệu chứng sốt cao và đau bụng vào ngày 6/4/2019. Sau 2 ngày tự điều trị tại nhà, trẻ được đưa tới BVĐK huyện Sóc Sơn, sau đó được đưa đi cấp cứu ngay trong ngày ở BV Xanh Pôn và được chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết hoại tử đường ruột. Trẻ đã tử vong vào tối ngày 9/4/2019 trước khi các xét nghiệm vi sinh được thực hiện.

- Ca bệnh thứ hai là bé trai 5 tuổi có triệu chứng sốt cao kèm đau bụng vào ngày 27/10/2019. Trẻ được điều trị ở nhà 1 ngày trước khi được đưa đi cấp cứu tại BV Nhi TƯ. Trẻ được chẩn đoán sốc nhiễm khuẩn huyết và tử vong sau đó 3 ngày. Xét nghiệm nuôi cấy vi sinh mẫu máu xác định trẻ dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei*.

- Ca bệnh thứ ba là bé trai 13 tháng tuổi, ngày 10/11/2019 trẻ biểu hiện sốt cao và kém ăn. Ngày 11/11/2019, trẻ được nhập viện và điều trị tại Trung tâm Y tế Sóc Sơn, sau đó chuyển lên BVĐK Sóc Sơn và tiếp tục chuyển lên BV Nhi TƯ ngay trong ngày. Xét nghiệm nuôi cấy vi sinh cho thấy trẻ dương tính với vi khuẩn *B. pseudomallei*. Trẻ tử vong sau 6 ngày khởi phát bệnh.

Theo các điều tra ca bệnh của TS. Trịnh Thành Trung trong vòng 5 năm qua, vùng này chưa từng ghi nhận ca nhiễm melioidosis (Trung et al., 2018). Để điều tra nguồn lây nhiễm vi khuẩn *B. pseudomallei*, nhóm nghiên cứu đã đến thăm gia đình các nạn nhân vào ngày 17/11/2019. Nhà của gia đình các nạn nhân được xây trên nền đất đồi tại vùng trung du của huyện Sóc Sơn. Cha mẹ và ông bà của 3 trẻ đã được phỏng vấn với các câu hỏi dịch tễ học về các hoạt động hàng ngày của trẻ ở trong nhà và xung quanh nhà. Theo thông tin từ gia đình, 3 trẻ không chơi nghịch đất/nước ở ngoài vườn, trẻ chỉ tiếp xúc với nguồn nước giếng khoan khi tắm. Nước uống dùng trong gia đình đều được lọc và đun sôi trước khi sử dụng. Gia đình sử dụng nước được cung cấp từ 3 giếng khoan: giếng dùng để tắm (giếng A), giếng cho gia súc (giếng B) và giếng cho nước ăn/uống (giếng C). Các mẫu đất vườn

trước nhà (n = 7), nước giếng khoan (lấy từ təc nước) (n = 9), và nước uống (n = 1) đã được thu thập, xét nghiệm sự hiện diện của vi khuẩn *B. pseudomallei*. Kết quả cho thấy 3/3 (100%) mẫu nước giếng khoan A dương tính với *B. pseudomallei*, trong đó có 2/3 mẫu dương tính bằng nuôi cấy trực tiếp với mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* là 1-3 CFU/mL; 1/3 mẫu dương tính bằng nuôi cấy làm giàu 2 bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ. Trong khi các mẫu nước giếng B, C và mẫu đất đều âm tính với vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng cả nuôi cấy trực tiếp và nuôi cấy làm giàu (Bảng 3.21).

**Bảng 3.21.** Kết quả nuôi cấy xác định sự có mặt của *B. pseudomallei* trong đất và nước thu thập tại gia đình nạn nhân và khu vực xung quanh tại thôn Đô Lương, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn, Hà Nội

Loại mẫu	Số mẫu	Số điểm	Số mẫu dương tính bằng làm giàu 2 bước /tổng số mẫu (%)	Số mẫu dương tính bằng nuôi cấy trực tiếp /tổng số mẫu (%) (Mật độ CFU/g; CFU/mL, khoảng)
<b>Thu mẫu lần 1 (17/11/2019)</b>				
Đất vườn trước	7	7	0/7 (0)	0/7 (0)
Nước giếng A	3	1	3/3 (100)	3/3 (100) (1-3)
Nước giếng B	3	1	0/3 (0)	0/3 (0)
Nước giếng C	3	1	0/3 (0)	0/3 (0)
Nước uống	1	1	0/1 (0)	0/1 (0)
<b>Thu mẫu lần 2 (23/11/2019)</b>				
Đất vườn sau, cạnh giếng A	46	10	27/46 (58,7)	5/46 (10,8) (12-746)
Đất ruộng lúa	40	8	5/40 (12,5)	0/40
Nước giếng A	26	1	26/26 (100)	0/26
Nước giếng B	3	1	0/3 (0)	0/3
Nước giếng C	3	1	0/3 (0)	0/3
Nước giếng hàng xóm	33	11	0/33 (0)	0/33
Nước ao	30	10	0/30 (0)	0/30
<b>Tỉ lệ mẫu dương tính/tổng số mẫu</b>			<b>61/198 (30,96%)</b>	<b>8/198 (4,06%) (1-746 CFU/g/mL)</b>

Sau khi phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong təc nước được bơm từ giếng khoan A, đợt thu mẫu lần thứ 2 đã được tiến hành nhằm mở rộng điều tra nguồn nhiễm *B. pseudomallei*. Theo thông tin được cung cấp, giếng khoan A được khoan vào năm 2010, sau 5 năm, gia đình đã cải tạo khu vườn xung quanh giếng khoan A (phía sau nhà) bằng cách phủ lên vườn một lớp đất, dẫn đến miệng lỗ khoan nằm dưới bề mặt đất khoảng 80 cm (Phụ lục 9A). Cuối năm 2018, bộ phận côn thu trong đường ống hút của máy bơm nước bị hỏng và được sửa chữa. Nhưng sau đó, miệng lỗ khoan không được bịt kín (Phụ lục 9B), việc này có thể đã tạo điều kiện cho nước mưa kéo theo các hạt đất bề mặt bị nhiễm *B. pseudomallei* chảy vào mạch nước ngầm qua miệng lỗ khoan bị hở. Để kiểm tra giả thuyết này, nghiên cứu đã tập trung vào việc thu thập mẫu nước của giếng A và đất vườn xung quanh giếng A. Ngoài ra, môi trường quanh vùng bán kính 1 km quanh nhà các nạn nhân cũng được điều tra.

Kết quả điều tra đợt mẫu thu lần 2 cho thấy 26/26 mẫu nước (100%) của giếng khoan A; 27/46 mẫu đất vườn (58,7%) tại 8/10 điểm (80%) và 5/40 mẫu đất tại 2/8 ruộng lúa dương tính với *B. pseudomallei*. Đặc biệt, nuôi cấy trực tiếp chỉ phát hiện được 5 mẫu đất vườn tại 2 điểm dương tính với *B. pseudomallei*, trong khi kỹ thuật nuôi cấy làm giàu 2 bước TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ đã phát hiện thêm được 26 mẫu nước bơm trực tiếp từ giếng A, 22 mẫu đất vườn và 8 mẫu đất ruộng dương tính với *B. pseudomallei*. Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh giả thuyết rằng *B. pseudomallei* có thể bị kéo theo cùng với đất bề mặt vào mạch nước ngầm qua miệng giếng khoan không đậy kín trong mùa mưa năm sau, bắt đầu từ tháng 4/2019, trùng với thời điểm phát bệnh và tử vong của đứa trẻ đầu tiên (Bảng 3.21).

Nuôi cấy định lượng phát hiện 5 mẫu đất vườn tại 2 điểm thu mẫu có mật độ *B. pseudomallei* trung bình là 406 CFU/g đất (dao động từ 12 đến 746 CFU/g đất). Đáng chú ý, mật độ vi khuẩn tại 2 điểm này có mối tương quan với độ sâu lấy mẫu khi thời điểm lấy mẫu trùng với mùa khô ở miền Bắc. Tại điểm thứ nhất, mật độ *B. pseudomallei* là 12, 406 và 746 CFU/g đất ở độ sâu tương ứng 30, 40 và 50 cm. Tại

điểm thứ hai, mật độ vi khuẩn là 52 và 740 CFU/g đất ở độ sâu 40 và 50 cm (Bảng 3.22). Mật độ cũng như tần suất bắt gặp vi khuẩn *B. pseudomallei* tăng ở độ sâu hơn 30 cm cũng đã được nhiều nghiên cứu công bố, đặc biệt là vào thời điểm mùa khô (Wuthiekanun et al., 1995; Kao et al., 2003; Wuthiekanun et al., 2005; Kaestli et al., 2007; Manivanh et al., 2017).

**Bảng 3.22.** Môi trường quan giữa độ sâu lỗ khoan đất và mật độ vi khuẩn *B. pseudomallei* tại 2 điểm dương tính

STT	Mã vị trí thu mẫu	Độ sâu lỗ khoan (cm)	Mật độ <i>B. pseudomallei</i> (CFU/g đất)
1	SD2	30	12
2		40	406
3		50	746
4	SD6	40	52
5		50	740

Hiện tượng nguồn nước sinh hoạt nói chung và nước giếng khoan nói riêng bị nhiễm vi khuẩn *B. pseudomallei* đã được ghi nhận ở nhiều quốc gia vùng dịch như Úc, Thái Lan hay Lào (Mayo et al., 2011, Vongphayloth et al., 2012, McRobb et al., 2013, Limmathurotsakul et al., 2014). Tại bắc Úc, một nghiên cứu ghi nhận 12/47 (26%) giếng khoan dương tính với *B. pseudomallei* vào mùa khô, và 11/36 (29%) giếng khoan dương tính với *B. pseudomallei* vào mùa mưa (McRobb et al., 2013). Trong một nghiên cứu khác, tỉ lệ này cao hơn với 33% (18/55) mẫu giếng khoan lấy từ các khu dân cư dương tính với *B. pseudomallei* (Mayo et al., 2011). Khi nghiên cứu điều tra *B. pseudomallei* trong nguồn nước uống tại Thái Lan, Limmathurotsakul và cs (2014) đã công bố 10/84 giếng khoan (12%) và 1/27 giếng khơi (4%) nhiễm *B. pseudomallei* với mật độ vi khuẩn tương ứng trong khoảng 1-65 CFU/mL và 31 CFU/mL (Limmathurotsakul et al., 2014). Các nghiên cứu trên cũng đưa ra bằng chứng về mối liên hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phân lập được từ nguồn nước và từ bệnh nhân melioidosis liên quan tới nguồn nước.



So sánh với các mẫu nước giếng khoan âm tính với *B. pseudomallei*, mẫu nước giếng khoan A có pH thấp hơn, hàm lượng nitrate, sắt, tổng chất rắn lơ lửng và tổng carbon hữu cơ cao hơn đáng kể (Phụ lục 10). Bên cạnh đó, mẫu đất dương tính với *B. pseudomallei* được lấy ở vườn xung giếng khoan A có độ dẫn điện thấp hơn, tổng hàm lượng kali oxit và nhôm cao hơn nhiều so với các mẫu đất âm tính với *B. pseudomallei* (Phụ lục 11). Kết quả này tương đồng với nhiều công bố trước đó về mối tương quan giữa pH thấp, độ dẫn điện thấp và hàm lượng nitrat, sắt, carbon hữu cơ cao trong môi trường với sự có mặt của vi khuẩn *B. pseudomallei* (Palasatien et al., 2008; Kaestli et al., 2009; Manivanh et al., 2017). Trong khi đó, các đặc điểm của giếng khoan như tuổi lỗ khoan, độ sâu, tầng chứa nước, khả năng tích tụ nước tại lỗ khoan và vị trí thu mẫu (đầu khoan, trực, tầng chứa nước hoặc bề chứa) giữa giếng dương tính và âm tính với *B. pseudomallei* được nghiên cứu của Draper và cs (2010) tại Úc nhận định là không có sự khác biệt. Đáng chú ý, nghiên cứu của Draper và cs (2010) đã báo cáo việc bịt kín miệng lỗ khoan có hiệu quả đáng kể trong việc làm giảm tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *B. pseudomallei* (21% so với 44% vào mùa khô và 29% so với 44% vào mùa mưa) (Draper et al., 2010). Những phát hiện này góp phần nâng cao nhận thức của người dân trong việc xây dựng và sửa chữa các giếng khoan để tránh nhiễm *B. pseudomallei* từ đất/nước bề mặt. Tuy nhiên, việc *B. pseudomallei* hiện diện trong nước giếng là do sự xâm nhập nước bề mặt hoặc tầng nước nông trong mùa mưa hay do sự xuất hiện tự nhiên trong tầng nước sâu như giếng khoan vẫn là một câu hỏi cần được giải đáp (Kaestli et al., 2019). Hơn nữa, ngay cả khi giả định thứ nhất xảy ra, thì sự hiện diện của *B. pseudomallei* trong các giếng khoan không chỉ là hậu quả của sự nhiễm ban đầu mà còn phụ thuộc vào các thông số lý hóa của nước thích hợp cho sự tồn tại và sinh trưởng của *B. pseudomallei* hay không (Draper et al., 2010). Mối liên hệ chặt chẽ giữa đặc tính lý hóa của nước với sự hiện diện của *B. pseudomallei* cho thấy rằng các thông số này có thể được coi là chỉ thị để xác định ô nhiễm loài vi khuẩn này (Draper et al., 2010).

Mối quan hệ di truyền của các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ ngoài môi trường và trong lâm sàng đã được đánh giá qua phân tích MLST 20 chủng *B. pseudomallei*. Kết quả cho thấy cả 20 chủng đều thuộc ST 541, cụ thể gồm 7 chủng từ giếng khoan A, 6 chủng từ đất tại khu vườn sau xung quanh giếng khoan A, 5 chủng từ ruộng lúa và 2 chủng lâm sàng từ 2 đứa trẻ. Nghiên cứu của luận án chỉ bắt gặp một ST duy nhất của các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ các mẫu môi trường và lâm sàng, trong khi các nghiên cứu ở Úc và Thái Lan đã phát hiện sự đa dạng các ST từ nước giếng khoan, đất và bệnh phẩm lâm sàng (Wuthiekanun et al., 2009; Mayo et al., 2011). Vì cả 3 ca bệnh nhiễm trùng melioidosis đều xảy ra ở trẻ em, nên việc lây nhiễm *B. pseudomallei* được dự đoán có thể xảy ra do nạn nhân đã uống nước bị ô nhiễm trong khi tắm; đặc biệt là khi nạn nhân 13 tháng tuổi không tiếp xúc với đất vườn hay ruộng lúa. Khả năng nuốt phải vi khuẩn *B. pseudomallei* cũng có thể giải thích cho các triệu chứng tiêu hóa mà trẻ biểu hiện khi phát bệnh.

Chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* ST541 đã được báo cáo từ các trường hợp nhiễm melioidosis trên người tại miền Bắc Việt Nam và được phân lập từ mẫu đất thu tại miền Bắc và bắc Trung bộ (Phuong et al., 2008, Trung et al., 2018). Ngoài các chủng *B. pseudomallei* có nguồn gốc từ Việt Nam, cơ sở dữ liệu MLST (<https://pubmlst.org/organisms/burkholderia-pseudomallei>) chỉ báo cáo một chủng ST541 được phân lập từ bệnh nhân melioidosis thuộc Hải Nam, Trung Quốc. Qua tra cứu dữ liệu lâm sàng, 5 trong số 8 bệnh nhân nhiễm *B. pseudomallei* ST541 đã tử vong, điều này cho thấy ST541 có độc lực mạnh hơn các ST khác, tuy nhiên vẫn cần được nghiên cứu thêm.

## KẾT LUẬN

### **1. Phát triển và ứng dụng kỹ thuật miễn dịch xét nghiệm nhanh melioidosis từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng**

Phát triển thành công kỹ thuật WC/Hcp1-ELISA sử dụng kháng nguyên từ chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 thuộc ST46 phổ biến ở Việt Nam để xét nghiệm melioidosis ở người Việt có độ nhạy và độ đặc hiệu cao tương ứng là 98,4% và 95,1%. WC/Hcp1-ELISA phát hiện 52/511 (10,2%) và 41/500 (8,2%) mẫu huyết thanh dương tính với melioidosis tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh và BV TƯ Huế. Trong đó, có 14/14 (100%) và 21/23 (91,3%) bệnh nhân dương tính với melioidosis được khẳng định bằng nuôi cấy tại 2 bệnh viện trên được phát hiện bằng WC/Hcp1-ELISA.

### **2. Phát triển và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy có độ nhạy cao để điều tra vi khuẩn *B. pseudomallei* ngoài môi trường.**

Phát triển thành công kỹ thuật nuôi cấy làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) điều tra *B. pseudomallei* trong đất với tỷ lệ phát hiện cao hơn gần 2 lần so với hướng dẫn chuẩn (TBSS-C50 48 giờ) khi đánh giá bằng real-time PCR TTSS1; cao hơn 6 lần khi đánh giá bằng phân lập trên đĩa thạch Ashdown. Kỹ thuật làm giàu hai bước (TBSS-C50 48 giờ + EM 96 giờ) phát hiện 348/800 (43,5%) số mẫu nước ruộng lúa tại Triệu Sơn-Thanh Hóa; 100% mẫu nước giếng tắm và 57,8% mẫu đất vườn tại Sóc Sơn-Hà Nội dương tính với *B. pseudomallei*.

## **KIẾN NGHỊ**

Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chính xác của kỹ thuật xét nghiệm kết hợp WC/Hcp1-ELISA trên bệnh nhân nghi ngờ melioidosis tại ba thời điểm là: nhập viện, điều trị và tái khám sau xuất viện 2 tuần; so sánh chúng với phương pháp nuôi cấy và real-time PCR.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Tran Q.T.L.**, Phan P.H., Bui L.N.H., Bui H.T.V., Hoang N.T.B., Tran D.M., Trinh T.T. (2022), “Child Melioidosis Deaths Caused by *Burkholderia pseudomallei*-Contaminated Borehole Water, Vietnam, 2019”, *Emerg Infect Dis.* Vol. 28(8), pp.1689-1693.
2. **Tran Q.T.L.**, Nguyen H.V., Pham H.T., Mai T.V., Nguyen Q.H.M., Le D.V., Bui L.N.H., Hoang L.T.H., Hoang T.Q., Trinh T.T. (2022), “Clinical Utility of Combined Whole-cell Antigen and Recombinant Hemolysin Co-regulated Protein 1-Enzyme-linked Immunosorbent Assays Reveals Underdiagnosed Cases of Melioidosis in Vietnam”, *Am J Trop Med Hyg.* Vol. 107(3), pp. 585-91.
3. **Trần Thị Lệ Quyên**, Nguyễn Thị Tình, Bùi Nguyễn Hải Linh, Đỗ Quốc Tuấn, Trần Anh Đào, Phạm Thị Huyền, Trịnh Hồ Tình, Quế Anh Trâm, Hoàng Quang Trung, Trịnh Thành Trung (2020), “Đánh giá kháng nguyên tái tổ hợp hemolysin co-regulated protein 1 (hcp1) trong chẩn đoán nhanh bệnh nhân nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore) bằng kỹ thuật ELISA”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Tập 62 (9) 9, tr. 26-31.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Lê Huy Chính, (2007), Vi sinh vật y học (Sách đào tạo bác sĩ đa khoa), NXB Y học, Bộ Y tế, tr. 221-224.

### Tiếng Anh

2. Achappa B., Madi D. and Vidyalakshmi K., (2016), “Cutaneous melioidosis”, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol. 10(9), pp. WD01-02.
3. Allwood E.M., Devenish R.J., Prescott M., Adler B. and Boyce J.D., (2011), “Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*”, *Frontiers in microbiology*, Vol. 2, pp. 170.
4. Ashdown L.R., (1979a), “An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens”, *Pathology*, Vol, 11(2), pp. 293-297.
5. Ashdown L.R., (1979b). “Nosocomial infection due to *Pseudomonas pseudomallei*: two cases and an epidemiologic study”, *Reviews of infectious diseases*, Vol, 1(5), pp. 891-894.
6. Azura M.N., Norazah A., Kamel A.G., Zorin S.A., (2011), “Fingerprinting of septicemic and localized *Burkholderia pseudomallei* isolates from Malaysian patients”, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Vol, 42(1), pp.114–21.
7. Baker A., Tahani D., Gardiner C., Bristow K.L., Greenhill A.R. and Warner J., (2011), “Groundwater seeps facilitate exposure to *Burkholderia pseudomallei*”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 77(20), pp. 7243-7246.
8. Baker A.L., Ezzahir J., Gardiner C., Shipton W. and Warner J.M., (2015), “Environmental attributes influencing the distribution of *Burkholderia pseudomallei* in Northern Australia”, *PloS one*, Vol 10(9), pp. e0138953.
9. Bakken L.R. and Olsen R.A., (1987), “The relationship between cell size and viability of soil bacteria”, *Microbial ecology*, Vol, 13(2), pp.103–14.
10. Biegeleisen J.Z., Mosquera M. and Cherry W.B., (1964), “A case of human melioidosis: clinical, epidemiological and laboratory findings”, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 13(1), pp. 89-99.

11. Brett P.J., DeShazer D. and Woods D.E., (1998), “Note: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 48(1), pp. 317-320.
12. Burkholder W.H., (1942), “Three bacterial plant pathogens. *Phytomonas caryophylli* sp. n., *Phytomonas alliicola* sp. n. and *Phytomonas manihotis* (Artaud, Berthet and Bondar) Viégas”, *Phytopathology*, Vol. 32(2), pp. 141-149.
13. Burkholder W.H., (1950), “Sour skin, a bacterial rot”, *Phytopathology*, Vol. 40, pp. 115-117.
14. Burtnick M.N., Brett P.J., Harding S.V., Ngugi S.A., Ribot W.J., Chantratita N., Scorpio A., Milne T.S., Dean R.E. and Fritz D.L., (2011), “The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*”, *Infection and immunity*, Vol, 79(4), pp. 1512-1525.
15. Burtnick M.N. and Brett P.J., (2013), “*Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* cluster 1 type VI secretion system gene expression is negatively regulated by iron and zinc”, *Plos One*, Vol, 8(10), pp. e76767.
16. Clayton A.J., Libella R. and Martin D.G., (1973), “Meloidosis: a serological survey in military personnel”, *Military medicine*, Vol. 138(1), pp. 24-26.
17. Currie B.J., Fisher D.A., Howard D.M., Burrow J.N., Selvanayagam S., Snelling P.L., Anstey N.M. and Mayo M.J., (2000), “The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea”, *Acta tropica*, Vol, 74(2-3), pp. 121-127.
18. Currie B.J., (2003), “Meloidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions”, *European Respiratory Journal*, Vol. 22(3), pp. 542-550.
19. Currie B.J., (2015), “Meloidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment”. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, *Thieme Medical Publishers*. Vol, 36(1), p. 111-25
20. Currie B.J., and Jacups S.P., (2003), “Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia”, *Emerging infectious diseases*, Vol. 9 (12), pp. 1538.
21. Currie B.J., Dance D.A. and Cheng A.C., (2008), “The global distribution of

*Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 102, pp. 1-4.

22. Currie B.J., Jacups S.P., Cheng A.C., Fisher D.A., Anstey N.M., Huffam S.E. and Krause V.L., (2004), “Melioidosis epidemiology and risk factors from a prospective whole-population study in northern Australia”, *Tropical Medicine & International Health*, Vol. 9(11), pp. 1167-1174.

23. Currie B.J., Mayo M., Anstey N.M., Donohoe P., Haase A. and Kemp D.J., (2001), “A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates”. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 65(3), pp. 177-179.

24. Currie B.J., Ward L. and Cheng A.C., (2010), “The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 4(11), pp. e900.

25. Chaichana P., Jenjaroen K., Amornchai P., Chumseng S., Langla S., Rongkard P., Sumonwiriya M., Jeeyapant A., Chantratita N. and Teparrukkul P., (2018), “Antibodies in melioidosis: the role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 99(6), pp. 1378.

26. Chambon L., (1955), “Isolement du bacille de Whitmore a partir du milieu extérieur”, *Ann. Inst. Pasteur*, Vol. 89, pp. 229–235.

27. Chandler D.P., Brockman F. J., Bailey T. and Fredrickson J. K., (1998), “Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol”, *Microbial Ecology*, Vol. 36(1), pp. 37-50.

28. Chantratita N., Meumann E., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Wannapasni S., Tumapa S., Day N.P. and Peacock S.J., (2008), “Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 46(2), pp. 568-573.



29. Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K., Tiyawisutsri R., Vesaratchavest M., Limmathurotsakul D., Chierakul W., Wongratanacheewin S., Pukritiyakamee S. and White N.J., (2007), "Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*", *Journal of bacteriology*, Vol. 189(3), pp. 807-817.
30. Chantratita N., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Vesaratchavest M., Thanwisai A., Amornchai P., Tumapa S., Feil E.J., Day N.P. and Peacock S.J., (2008), "Genetic diversity and microevolution of *Burkholderia pseudomallei* in the environment", *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 2(2), pp. e182.
31. Chantratita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Cheng A. C., Chierakul W., Day N.P. and Peacock S.J., (2007), "Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis", *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 14(1), pp. 110-113.
32. Chen Y., Chen S., Kao C. and Chen Y., (2003), "Effects of soil pH, temperature and water content on the growth of *Burkholderia pseudomallei*", *Folia microbiologica*, Vol. 48(2), pp. 253-256.
33. Chenthamarakshan V., Vadivelu J. and Puthuchery S., (2001), "Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*", *Diagnostic microbiology and infectious disease*, Vol. 39(1), pp. 1-7.
34. Cheng A.C., Godoy D., Mayo M., Gal D., Spratt B.G. and Currie B.J., (2004), "Isolates of *Burkholderia pseudomallei* from northern Australia are distinct by multilocus sequence typing, but strain types do not correlate with clinical presentation", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 42(12), pp. 5477-5483.
35. Cheng A.C., and Currie B.J., (2005), "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management", *Clinical microbiology reviews*, Vol. 18(2), pp. 383-416.
36. Cheng A.C., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Wongsuvan G., Day N.P. and Peacock S.J., (2006), "Role of selective and nonselective media for isolation of *Burkholderia pseudomallei* from throat swabs of patients with melioidosis",

*Journal of clinical microbiology*, Vol. 44(6), pp. 2316-2316.

37. Chewapreecha C., Holden M.T., Vehkala M., Välimäki N., Yang Z., Harris S. R., Mather A.E., Tuanyok A., De Smet B. and Le Hello S., (2017), “Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*” *Nature microbiology*, Vol. 2(4), pp. 1-8.

38. Chieng S., Mohamed R. and Nathan S., (2015), “Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker”, *Microbial pathogenesis*, Vol. 79, pp. 47-56.

39. Chua K., Chan Y. and Gan Y., (2003), “Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei*”, *Infection and immunity*, Vol. 71(4), pp. 1622-1629.

40. Chua K.H., Tan E.W., Chai H.C., Puthuchery S., Lee P.C. and Pua S.M., (2020), “Rapid identification of melioidosis agent by an insulated isothermal PCR on a field-deployable device”, *PeerJ*, Vol. 8, pp. e9238.

41. Coenye T., Vandamme P., Govan J.R., LiPuma J.J., (2001), “Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex”, *J Clin Microbiol.*, 39(10), pp. 3427-36.

42. Dance D., (1991), “Melioidosis: the tip of the iceberg?”, *Clinical microbiology reviews*, Vol. 4(1), pp. 52-60.

43. Dance D.A.B., (2004), *Melioidosis*. In: Guerrant RL, Walker, D. H., Weller, P. F., “*Tropical Infectious Diseases: principles, pathogens, & practice*”. 2 ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, pp 381–388.

44. Dance D.A., Knappik M., Dittrich S., Davong V., Silisouk J., Vongsouvath M., Rattanavong S., Pierret A., Newton P.N. and Amornchai P., (2018), “Evaluation of consensus method for the culture of *Burkholderia pseudomallei* in soil samples from Laos”, *Wellcome open research*, Vol. 3, pp. 132

45. de Lajudie P.M. and Young J.P.W., (2017), “International committee on systematics of prokaryotes subcommittee for the taxonomy of rhizobium and agrobacterium minutes of the meeting, budapest, 25 august 2016”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol. 67(7), pp. 2485-2494.

46. Deepak R.N., Crawley B. and Phang E., (2008), “*Burkholderia pseudomallei*

- identification: A comparison between the API 20NE and Vitek 2 GN systems”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 102, pp. S42-S44.
47. Deller J.J., (1969), “Diseases from Vietnam”, *California Medicine*, Vol. 111(6), pp. 461.
48. Depoorter E., Bull M.J., Peeters C., Coenye T., Vandamme P. and Mahenthiralingam E., (2016), “*Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers”, *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 100(12), pp. 5215-5229.
49. DeShazer D., Brett P.J., Carlyon R. and Woods D.E., (1997), “Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene”, *Journal of Bacteriology*, Vol. 179(7), pp. 2116-2125.
50. Diamond H.S. and Pastore R., (1967), “Septic arthritis due to *Pseudomonas pseudomallei*”, *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, Vol. 10(5), pp. 459-466.
51. Doker T.J., Quinn C.L., Salehi E.D., Sherwood J.J., Benoit T.J., Elrod M.G., Gee J.E., Shadomy S.V., Bower W.A. and Hoffmaster A.R., (2014), “Case report: Fatal *Burkholderia pseudomallei* infection initially reported as a *Bacillus* Species, Ohio, 2013”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 91(4), pp. 743.
52. Dowson W., (1929), “On the stem rot or wilt disease of carnations 1”, *Annals of Applied Biology*, Vol. 16(2), pp. 261-280.
53. Draper A.D., Mayo M., Harrington G., Karp D., Yinfoo D., Ward L., Haslem A., Currie B.J. and Kaestli M., (2010), “Association of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* with water parameters in rural water supplies in Northern Australia”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 76(15), pp. 5305-5307.
54. Mo D.H. and Cuong T.H., (1967), “A typical case of melioidosis in South Vietnam”, *Military Medicine*, Vol. 132(2), pp. 98-100.
55. Duroux A., (1965), “Pulmonary Melioidosis”, *Le Poumon et le coeur*, Vol. 21, pp. 355-372.

56. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E., Chantratita N., Tandhavanant S., Limmathurotsakul D. and Hoffmaster A.R., (2014), "Evaluation of a latex agglutination assay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 90(6), pp. 1043-1046.
57. Eberl L. and Vandamme P. , (2016), "Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys", *F1000Research*, Vol. 5, p. 1007.
58. Everett E.D. and Nelson R.A., (1975), "Pulmonary melioidosis: observations in thirty-nine cases", *American Review of Respiratory Disease*, Vol. 112(3), pp. 331-340.
59. Felgner P.L., Kayala M.A., Vigil A., Burk C., Sasaki N.R., Pablo J., Molina D.M., Hirst S., Chew J.S. and Wang D., (2009), "A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 106(32), pp. 13499-13504.
60. Fong S.M., Wong K.J., Fukushima M. and Yeo T.W., (2015), "Thalassemia major is a major risk factor for pediatric melioidosis in Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 60(12), pp. 1802-1807.
61. Francis A., Aiyar S., Yean C.Y., Naing L. and Ravichandran M., (2006), "An improved selective and differential medium for the isolation of *Burkholderia pseudomallei* from clinical specimens", *Diagnostic microbiology and infectious disease*, Vol. 55(2), pp. 95-99.
62. Gal D., Mayo M., Spencer E., Cheng A.C. and Currie B.J., (2005), "Application of a polymerase chain reaction to detect *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens from patients with suspected melioidosis", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 73(6), pp. 1162-1164.
63. Galimand M. and Dodin A., (1982), "Focus on melioidosis throughout the world", *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, Vol. 75(4), pp. 375-383.
64. Giagnoni L., Arenella M., Galardi E., Nannipieri P., Renella G., (2018), "Bacterial culturability and the viable but non-culturable (VBNC) state studied by a proteomic approach using an artificial soil", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol.

118, pp. 51–8.

65. Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R. and Spratt B.G., (2003), “Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*”. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 41(5), pp. 2068-2079.

66. Göhler A., Trung T.T., Hopf V., Kohler C., Hartleib J., Wuthiekanun V., Peacock S.J., Limmathurotsakul D., Tuanyok A. and Steinmetz I., (2017), “Multitarget quantitative PCR improves detection and predicts cultivability of the pathogen *Burkholderia pseudomallei*”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 83(8), pp. e03212-03216

67. Guillermand J., Barrié J., Morilleau R. and Couderc P., (1964), “Mélioiïdose pulmonaire chronique (Observation anatomoclinique)”, *Poumon Couer*, Vol. 20, pp. 269-285.

68. Gilmore G., Barnes J., Ketheesan N. and Norton R., (2007), “Use of antigens derived from *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. cepacia* in the indirect hemagglutination assay for melioidosis”, *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 14(11), pp.1529-1531.

69. Haase A., Brennan M., Barrett S., Wood Y., Huffam S., O’Brien D. and Currie B., (1998), “Evaluation of PCR for diagnosis of melioidosis”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 36(4), pp. 1039-1041.

70. Hagen R., Gauthier Y., Sprague L., Vidal D., Zysk G., Finke E. and Neubauer H., (2002), “Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues”, *Molecular Pathology*, Vol. 55(6), pp. 398.

71. Hall C.M., Busch J.D., Shippy K., Allender C.J., Kaestli M., Mayo M., Sahl J.W., Schupp J.M., Colman R.E. and Keim P., (2015), “Diverse *Burkholderia* species isolated from soils in the southern United States with no evidence of *B. pseudomallei*”, *PLoS One*, Vol. 10(11), pp. e0143254.

72. Hamad M.A., Austin C.R., Stewart A.L., Higgins M., Vázquez-Torres A. and Voskuil M.I., (2011), “Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic

*Burkholderia pseudomallei*”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 55(7), pp. 3313-3323.

73. Hantrakun V., Rongkard P., Oyuchua M., Amornchai P., Lim C., Wuthiekanun V., Day N.P., Peacock S.J. and Limmathurotsakul D., (2016), “Soil nutrient depletion is associated with the presence of *Burkholderia pseudomallei*”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 82(24), pp. 7086-7092.

74. Hantrakun V., Thaipadungpanit J., Rongkard P., Srilohasin P., Amornchai P., Langla S., Mukaka M., Chantratita N., Wuthiekanun V. and Dance D.A., (2018), “Presence of *B. thailandensis* and *B. thailandensis* expressing *B. pseudomallei*-like capsular polysaccharide in Thailand, and their associations with serological response to *B. pseudomallei*”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 12(1), pp. e0006193.

75. Hara Y., Chin C.Y., Mohamed R., Puthuchearry S.D. and Nathan S., (2013), “Multiple-antigen ELISA for melioidosis-a novel approach to the improved serodiagnosis of melioidosis”, *BMC infectious diseases*, Vol. 13(1), pp. 1-8.

76. Harris P.N., Ketheesan N., Owens L., Norton R.E., (2009), “Clinical features that affect indirect-hemagglutination assay responses to *Burkholderia pseudomallei*”, *Clin Vaccine Immunol*, Vol. 16(6), pp. 924–30

77. Himsley F.H., (1968), “Selection and rapid identification of *Pseudomonas pseudomallei* from other Gram-negative bacteria”, *American journal of clinical pathology*, Vol. 49(6), pp. 850-856.

78. Hemlock C., Luby S.P., Saha S., Qamar F., Andrews J.R., Saha S.K., Tamrakar D., Date K., Longley A.T. and Garrett D.O., (2020), “Utilization of blood culture in South Asia for the diagnosis and treatment of febrile illness”, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 71(Supplement\_3): S266-S275.

79. Henckel T., Friedrich M., Conrad R., (1999), “Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 65(5), pp.1980–90.

80. Hoffmaster A.R., AuCoin D., Baccam P., Baggett H.C., Baird R., Bhengsri S.,

- Blaney D.D., Brett P.J., Brooks T.J. and Brown K.A., (2015), “Melioidosis diagnostic workshop, 2013”, *Emerging infectious diseases*, Vol. 21(2), pp. e141045
81. Holden M.T., Titball R.W., Peacock S.J., Cerdeño-Tárraga A.M., Atkins T., Crossman L.C., Pitt T., Churcher C., Mungall K. and Bentley S.D., (2004), “Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 101(39), pp. 14240-14245.
82. Houghton R.L., Reed D.E., Hubbard M.A., Dillon M.J., Chen H., Currie B.J., Mayo M., Sarovich D.S., Theobald V., Limmathurotsakul D. and Wongsuvan G., (2014), “Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis”, *PLoS Negl Trop Dis*, Vol.8(3), pp. e2727.
83. Howard K. and Inglis T., (2003), “Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 41(7), pp. 3312-3316.
84. Inglis T.J., O'Reilly L., Merritt A.J., Levy A. and Heath C., (2011), “The aftermath of the Western Australian melioidosis outbreak”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 84(6), pp. 851.
85. Inglis T.J. and Sagripanti J.L., (2006), “Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72(11), pp. 6865-6875.
86. Jolley K.A. and Maiden M.C., (2010), “BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level”, *BMC bioinformatics*, Vol. 11(1), pp. 1-11.
87. Kaestli M., Mayo M., Harrington G., Ward L., Watt F., Hill J.V., Cheng A.C. and Currie B.J., (2009), “Landscape changes influence the occurrence of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in soil in northern Australia”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 3(1), pp. e364.
88. Kaestli M., Mayo M., Harrington G., Watt F., Hill J., Gal D. and Currie B.J., (2007), “Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia”,

*Applied and environmental microbiology*, Vol. 73(21), pp. 6891-6897.

89. Kaestli M., O'Donnell M., Rose A., Webb J.R., Mayo M., Currie B.J. and Gibb K., (2019). "Opportunistic pathogens and large microbial diversity detected in source-to-distribution drinking water of three remote communities in Northern Australia", *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 13(9), pp. e0007672.

90. Kamthan A., Shaw T., Mukhopadhyay C., Kumar S., (2018), "Molecular analysis of clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates from southwestern coastal region of India, using multilocus sequence typing", *PLoS Negl Trop Dis*, Vol. 12(11), pp. e0006915

91. Knief C., Delmotte N., Chaffron S., Stark M., Innerebner G., Wassmann R., (2012), "Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice", *The ISME journal*, Vol. 6(7), pp.1378–90.

92. Kao C., Chen S., Chen Y., Lin H. and Chen Y., (2003), "Detection of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields with PCR-based technique", *Folia microbiologica*, Vol. 48(4), pp. 521-524.

93. Karlin S., Weinstock G.M. and Brendel V., (1995), "Bacterial classifications derived from recA protein sequence comparisons", *Journal of bacteriology*, Vol. 177(23), pp. 6881-6893.

94. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N. and Kaewdaeng S., (2007), "Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*", *Diagnostic microbiology and infectious disease*, Vol. 59(3), pp. 277-281.

95. Knappik M., Dance D.A., Rattanavong S., Pierret A., Ribolzi O., Davong V., Silisouk J., Vongsouvath M., Newton P.N. and Dittrich S., (2015), "Evaluation of molecular methods to improve the detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil and water samples from Laos", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 81(11), pp. 3722-3727.

96. Ko W.C., Cheung B.M.H., Tang H.J., Shih H.I., Lau Y.J., Wang L.R. and Chuang Y.C., (2007), "Meloidosis outbreak after typhoon, southern Taiwan",



*Emerging infectious diseases*, Vol. 13(6), pp. 896.

97. Koh T.H., Ng L.S.Y., Ho J.L.F., Sng L.H., Wang G.C.Y. and Lin R.V.T.P., (2003), “Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 41(4), pp. 1809-1809.

98. Kohler C., Dunachie S.J., Müller E., Kohler A., Jenjaroen K., Teparrukkul P., Baier V., Ehricht R. and Steinmetz I., (2016), “Rapid and sensitive multiplex detection of *Burkholderia pseudomallei*-specific antibodies in melioidosis patients based on a protein microarray approach”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 10(7), pp. e0004847.

99. Koponen M.A., Zlock D., Palmer D.L. and Merlin T.L., (1991), “Melioidosis: forgotten, but not gone”, *Archives of internal medicine*, Vol. 151(3), pp. 605-608.

100. Kritsiriwuthinan K., Wajanarogana S., Choosang K., Homsian J. and Rerkthanom S., (2018), “Production and evaluation of recombinant *Burkholderia pseudomallei* GroEL and OmpA proteins for serodiagnosis of melioidosis”, *Acta tropica*, Vol. 178, pp. 333-339.

101. Kunakorn M., Raksakait K., Sethaudom C., Sermswan R.W. and Dharakul T., (2000), “Comparison of three PCR primer sets for diagnosis of septicemic melioidosis”, *Acta tropica*, Vol. 74(2-3), pp. 247-251.

102. Khosravi Y., Vellasamy K.M., Mariappan V., Ng S.L. and Vadivelu J., (2014), “Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Malaysian patients”, *The Scientific World Journal 2014*, Vol. 5, pp. 132971.

103. Lau S.K., Sridhar S., Ho C.C., Chow W.N., Lee K.C., Lam C.W., Yuen K.Y. and Woo P.C., (2015), “Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future”, *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 240(6), pp. 742-751.

104. Lau S.K., Tang B.S., Curreem S.O., Chan T.M., Martelli P., Cindy W., Wu A.K., Yuen K.Y. and Woo P.C., (2012), “Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*: importance of expanding databases with pathogens endemic to different localities”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 50(9), pp. 3142-3143.

105. Le Tohic S., Montana M., Koch L., Curti C. and Vanelle P., (2019), “A review of melioidosis cases imported into Europe”, *European Journal of Clinical*

*Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 38(8), pp. 1395-1408.

106. Lee S.W., Yi J., Joo S.I., Kang Y.A., Yoon Y.S., Yim J.J., Yoo C.G., Han S.K., Shim Y.S., Kim E.C., Kim Y.W., (2005), "A case of melioidosis presenting as migrating pulmonary infiltration: the first case in Korea", *Journal of Korean medical science*, Vol. 20(1), pp. 139-42.

107. Lim M., Tan E., Soh C. and Chang T., (1997), "*Burkholderia pseudomallei* infection in the Singapore Armed Forces from 1987 to 1994-an epidemiological review", *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, Vol. 26(1), pp. 13-17.

108. Limmathurotsakul D., Dance D.A., Wuthiekanun V., Kaestli M., Mayo M., Warner, J., Wagner D.M., Tuanyok A., Wertheim H., Cheng T.Y. and Mukhopadhyay C., (2013), "Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei*", *PLoS Negl Trop Dis*, Vol. 7(3), pp. e2105.

109. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P. and Peacock S.J., (2016), "Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis", *Nature microbiology*, Vol. 1(1), pp. 1-5.

110. Limmathurotsakul D., Jansen K., Arayawichanont A., Simpson J.A., White L.J., Lee S.J., Wuthiekanun V., Chantratita N., Cheng A. and Day N.P., (2010), "Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models", *PloS one*, Vol. 5(8), pp. e12485.

111. Limmathurotsakul D., Kanoksil M., Wuthiekanun V., Kitphati R., deStavola B., Day N.P. and Peacock S.J., (2013), "Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast Thailand: a matched case-control study", *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 7(2), pp. e2072.

112. Limmathurotsakul D., Wongratanacheewin S., Teerawattanasook N., Wongsuvan G., Chaisuksant S., Chetchotisakd P., Chaowagul W., Day N.P. and Peacock S.J., (2010), "Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 82(6), pp. 1113.

113. Limmathurotsakul D., Wongsuvan G., Aanensen D., Ngamwilai S., Saiprom N., Rongkard P., Thaipadungpanit J., Kanoksil M., Chantratita N. and Day N.P., (2014), “Melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* in drinking water, Thailand, 2012”, *Emerging infectious diseases*, Vol. 20(2), pp. 265.
114. Losada L., Ronning C.M., DeShazer D., Woods D., Fedorova N., Kim S., Shabalina S.A., Pearson T.R., Brinkac L. and Tan P., (2010), “Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements”, *Genome biology and evolution*, Vol. 2, pp. 102-116.
115. Lowe P., Engler C. and Norton R., (2002), “Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 40(12), pp. 4625-4627.
116. Lowe P., Haswell H. and Lewis K., (2006), “Use of various common isolation media to evaluate the new VITEK 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol.44(3), pp. 854-856.
117. Lu Y., Rosencrantz D., Liesack W., Conrad R., (2006), “Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere”, *Environmental microbiology*, Vol. 8(8), pp.1351–60.
118. Luong N. and Kim N., (1961), “La mélioirose porcine au Vietnam”, *Off. Int. Epizoot* Vol. 56, pp. 944-976.
119. Maharjan B., Chantratita N., Vesaratchavest M., Cheng A., Wuthiekanun V., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P. and Peacock S.J., (2005), “Recurrent melioidosis in patients in northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(12), pp. 6032-6034.
120. Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S.K., Radomski C., Davies J.E., Av-Gay Y. and Vandamme P., (2000), “DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38(9), pp. 3165-3173.
121. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., (1998), “Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms”, *Proc Natl Acad Sci U S*

A., Vol. 95(6), pp. 3140–5.

122. Malczewski A.B., Oman K.M., Norton R.E., Ketheesan N., (2005), “Clinical presentation of melioidosis in Queensland, Australia”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 99(11), pp. 856-60.

123. Manivanh L., A. Pierret , S. Rattanavong , O. Kounnavongsa , Y. Buisson , I. Elliott, J.L. Maeght, K. Xayyathip, J. Silisouk, M. Vongsouvath, R. Phetsouvanh, P.N. Newton, G. Lacombe, O. Ribolzi, E. Rochelle-Newall, D.A.B. Dance, (2017). “*Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties”, *Scientific reports*, Vol. 7(1), pp. 1-11.

124. Mayo M., Kaestli M., Harrington G., Cheng A.C., Ward L., Karp D., Jolly P., Godoy D., Spratt B.G. and Currie B.J., (2011), “*Burkholderia pseudomallei* in unchlorinated domestic bore water, Tropical Northern Australia”, *Emerging infectious diseases*, Vol. 17(7), pp. 1283.

125. McCormick J.B., Sexton D.J., McMurray J.G., Carey E., Hayes P. and Feldman R.A., (1975), “Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*”, *Annals of Internal Medicine*, Vol. 83(4), pp. 512-513.

126. McLeod C., Morris P.S., Bauert P.A., Kilburn C.J., Ward L.M., Baird R.W. and Currie B.J., (2015), “Clinical presentation and medical management of melioidosis in children: a 24-year prospective study in the Northern Territory of Australia and review of the literature”, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 60(1), pp. 21-26.

127. McRobb E., Kaestli M., Mayo M., Price E.P., Sarovich D.S., Godoy D., Spratt B.G. and Currie B.J., (2013), “Melioidosis from contaminated bore water and successful UV sterilization”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 89(2), pp. 367.

128. McRobb E., Sarovich D.S., Price E.P., Kaestli M., Mayo M., Keim P. and Currie B.J., (2015), “Tracing melioidosis back to the source: using whole-genome sequencing to investigate an outbreak originating from a contaminated domestic water supply”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 53(4), pp. 1144-1148.

129. Meumann E.M., Novak R.T., Gal D., Kaestli M.E., Mayo M., Hanson J.P., Spencer E., Glass M.B., Gee J.E., Wilkins P.P. and Currie B.J., ( 2006), “Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing

- melioidosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 44(8), pp. 3028-3030.
130. Mohapatra P.R. and Mishra B., (2022), “Burden of melioidosis in India and South Asia: Challenges and ways forward”, *The Lancet Regional Health-Southeast Asia*, Vol. 5(2), pp. 100004.
131. Moore R.A., Reckseidler-Zenteno S., Kim H., Nierman W., Yu Y., Tuanyok A., Warawa J., DeShazer D. and Woods D.E., (2004), “Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*”, *Infection and immunity*, Vol. 72(7), pp. 4172-4187.
132. Morrison R.E., Lamb A.S., Craig D.B. and Johnson W.M., (1988), “Melioidosis: a reminder”, *The American journal of medicine*, Vol. 84(5), pp. 965-967.
133. Mukhopadhyay C., Shaw T., Varghese G.M. and Dance D.A., (2018), “Melioidosis in South Asia (India, Nepal, Pakistan, Bhutan and Afghanistan)”, *Tropical medicine and infectious disease*, Vol. 3(2), pp. 51.
134. Nandi T. and Tan P., (2013), “Less is more: *Burkholderia pseudomallei* and chronic melioidosis”, *Mbio*, Vol. 4(5), pp. e00709-00713.
135. Nicholls L., (1930), “Melioidosis, with special reference to the dissociation of *Bacillus whitmori*”, *British journal of experimental pathology*, Vol. 11(6), pp. 393.
136. Nierman W.C., DeShazer D., Kim H.S., Tettelin H., Nelson K.E., Feldblyum T., Ulrich R.L., Ronning C.M., Brinkac L.M. and Daugherty S.C., (2004), “Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 101(39), pp. 14246-14251.
137. Norton R., Roberts B., Freeman M., Wilson M., Ashhurst-Smith C., Lock W., Brookes D., La Brooy J., (1998), “Characterisation and molecular typing of *Burkholderia pseudomallei*: are disease presentations of melioidosis clonally related?”, *FEMS Immunol Med Microbiol*, Vol. 20(1), pp. 37–44.
138. Novak R. T., Glass M.B., Gee J.E., Gal D., Mayo M.J., Currie B.J. and Wilkins P.P., (2006), “Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 44(1), pp. 85-90.
139. Ngamdee W., Tandhavanant S., Wikraiphat C., Reamtong O., Wuthiekanun

- V., Salje J., Low D.A., Peacock S.J. and Chantratita N., (2015), “Competition between *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*”, *BMC microbiology*, Vol. 15(1), pp. 1-15.
140. Ngaury V., Lemeshev Y., Sadkowski L. and Crawford G., (2005), “Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(2), pp. 970-972.
141. Stein W., Duc N.H., Low F.J., (1958), “Acute melioidosis”, *USA Armed Forces Med. J.*, Vol. 9, pp. 273–276.6.
142. Ong C.E., Wongsuvan G., Chew J.S., Kim T.Y., Teng L.H., Amornchai P., Wuthiekanun V., Day N.P., Peacock S.J. and Cheng T.Y., (2017), “Presence of *Burkholderia pseudomallei* in soil and paddy rice water in a rice field in Northeast Thailand, but not in air and rainwater”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 97(6), pp. 1702.
143. Osteraas G.R., Hardman J.M., Bass J.W. and Wilson C., (1971), “Neonatal melioidosis”, *American Journal of Diseases of Children*, Vol. 122(5), pp. 446-448.
144. Palasatien S., Lertsirivorakul R., Royros P., Wongratanacheewin S. and Sermswan R.W., (2008), “Soil physicochemical properties related to the presence of *Burkholderia pseudomallei*”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 102(Supplement 1): S5-S9.
145. Parry C.M., Wuthiekanun V., Hoa N.T.T., Diep T.S., Thao L.T.T., Loc P.V., Wills B.A., Wain J., Hien T.T. and White N.J., (1999), “Melioidosis in Southern Vietnam: clinical surveillance and environmental sampling”, *Clinical infectious diseases*, Vol. 29(5), pp. 1323-1326.
146. Patpong R., Barbara K., Viriya H., Kemajittra J., Manutsanun S., Panjaporn C., (2020), “Human Immune Responses to Melioidosis and Cross-Reactivity to Low-Virulence *Burkholderia* Species, Thailand”, *Emerging Infectious Disease journal*, Vol. 26(3), pp. 463.
147. Payne G.W., Ramette A., Rose H.L., Weightman A.J., Jones T.H., Tiedje J.M. and Mahenthiralingam E., (2006), “Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species”, *FEMS microbiology letters*, Vol. 259(1), pp. 126-132.
148. Payne G.W., Vandamme P., Morgan S.H., LiPuma J.J., Coenye T., Weightman

- A.J., Jones T.H. and Mahenthiralingam E., (2005), “Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 71(7), pp. 3917-3927.
149. Peacock S.J., (2006), “Melioidosis”, *Current opinion in infectious diseases*, Vol. 19(5), pp. 421-428.
150. Peacock S.J., G. Chieng, A.C. Cheng, D.A. Dance, P. Amornchai, G. Wongsuvan, N. Teerawattanasook, W. Chierakul, N.P. Day and V. Wuthiekanun, (2005), “Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(10), pp. 5359-5361.
151. Pitt T.L., Trakulsomboon S., Dance D.A., (2000), “Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*”, *Acta Trop.*, Vol. 74(2), pp.181–5.
152. Pons R., (1930), “Melioidosis. A Disease Common to Man, Rodents and Equines”, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Vol. 23, pp. 210-215.
153. Pons R. and M. Advier, (1927), “Melioidosis in Cochin China”, *Epidemiology & Infection*, Vol. 26(1), pp. 28-30.
154. Price E.P., D.S. Sarovich, J.R. Webb, J.L. Ginther, M. Mayo, J.M. Cook, M.L. Seymour, M. Kaestli, V. Theobald and C.M. Hall, (2013), “Accurate and rapid identification of the *Burkholderia pseudomallei* near-neighbour, *Burkholderia ubonensis*, using real-time PCR”, *PLoS One*, Vol. 8(8), pp. e71647.
155. Price E.P., Sarovich D.S., Viberg L., Mayo M., Kaestli M., Tuanyok A., Foster J.T., Keim P., Pearson T., Currie B.J., (2015), “Whole-genome sequencing of *Burkholderia pseudomallei* isolates from an unusual melioidosis case identifies a polyclonal infection with the same multilocus sequence type”, *J Clin Microbiol*, Vol. 53(1), pp. 282–6.
156. Pumpuang A., Dunachie S.J., Phokrai P., Jenjaroen K., Sintiprungrat K., Boonsilp S., Brett P.J., Burtnick M.N., Chantratita N., (2017), “Comparison of O-polysaccharide and hemolysin co-regulated protein as target antigens for serodiagnosis of melioidosis”, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Vol. 11(3), p. e0005499.
157. Pumpuang A., R. Phunpang, P. Ekchariyawat, A. Dulsuk, S. Loupha, K.

- Kwawong, Y. Charoensawat, E. Thiansukhon, N.P. Day and M.N. Burtnick, (2019), “Distinct classes and subclasses of antibodies to hemolysin co-regulated protein 1 and O-polysaccharide and correlation with clinical characteristics of melioidosis patients”, *Scientific reports*, Vol. 9(1), pp. 1-14.
158. Puthucheary S.D., (2009), “Melioidosis in Malaysia”, *Medical Journal of Malaysia*, Vol. 64(4), pp. 266-274.
159. Phokrai P., Karoonboonyanan W., Thanapattarapairoj N., Promkong C., Dulsuk A., Koosakulnirand S., Canovali S., Indrawattana N., Jutrakul Y., Wuthiekanun V. and Limmathurotsakul D., (2018), “A rapid immunochromatography test based on Hcp1 is a potential point-of-care test for serological diagnosis of melioidosis”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 56(8), pp. e00346-18.
160. Phuong D.M., Trung T.T., Breitbach K., Tuan N.Q., Nübel U., Flunker G., Khang D.D., Quang N.X. and Steinmetz I., (2008), “Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 102(Supplement1), pp. S30-S36.
161. Richardson L.J, Kaestli M., Mayo M., Bowers J.R., Tuanyok A., Schupp J., (2012), “Towards a rapid molecular diagnostic for melioidosis: Comparison of DNA extraction methods from clinical specimens”, *J Microbiol Methods*, Vol. 88(1), pp. 179–81.
162. Rizzi M.C, Rattavong S., Bouthasavong L., Seubsanith A., Vongsouvath M., Davong V., De Silvestri A., Manciuilli T., Newton P.N., Dance D.A.B., (2019), “Evaluation of the Active Melioidosis Detect™ test as a point-of-care tool for the early diagnosis of melioidosis: a comparison with culture in Laos”, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 113(12), pp. 757-763
163. Robertson G., Sorenson A., Govan B., Ketheesan N., Houghton R., Chen H., (2015), “Rapid diagnostics for melioidosis: a comparative study of a novel lateral flow antigen detection assay”, *J Med Microbiol*, Vol. 64(8), pp. 845–8.
164. Roe C., A.J. Vazquez, P.D. Phillips, C.J. Allender, R.A. Bowen, R.D.



- Nottingham, A. Doyle, G. Wongsuwan, V. Wuthiekanun and D. Limmathurotsakul, (2022), “Multiple phylogenetically-diverse, differentially-virulent *Burkholderia pseudomallei* isolated from a single soil sample collected in Thailand”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 16(2), pp. e0010172.
165. Rolim D.B., R.X.R. Lima, A.K.C. Ribeiro, R.M. Colares, L.D. Lima, A.J. Rodríguez-Morales, F.E. Montúfar and D.A. Dance, (2018), “Meloidosis in South America”, *Tropical Medicine and Infectious Disease*, Vol. 3(2), pp. 60.
166. Rotz L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M., (2002), “Public health assessment of potential biological terrorism agents”, *Emerg Infect Dis.*, Vol. 8(2), pp. 225–30.
167. Sanchez-Villamil, J.I. and A.G. Torres, (2018), “Meloidosis in Mexico, Central America, and the Caribbean”, *Tropical medicine and infectious disease*, Vol. 3(1), pp. 24.
168. Sanford J., (1978), “Meloidosis: forgotten but not gone”, *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, Vol. 89, pp. 201.
169. Sanford J.P. and W.L. Moore Jr., (1971), “Recrudescence melioidosis: a Southeast Asian legacy”, *American Lung Association*. Vol 104(3), pp. 452-3
170. Sarovich D.S., Price E.P., Webb J.R., Ward L.M., Voutsinos M.Y., Tuanyok A., Mayo M., Kaestli M. and Currie B.J., (2014), “Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease”, *PloS one* Vol. 9(3), pp. e91682.
171. Sawana A., Adeolu M., and Gupta R.S., (2014), “Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species”, *Frontiers in genetics*, Vol. 5, pp. 429.
172. Schweizer H.P., (2012), “Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis”, *Future microbiology*, Vol. 7(12), pp. 1389-1399.
173. Simpson A.J., N.J. White and V. Wuthiekanun, (1999), “Aminoglycoside and

macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 43(9), pp. 2332-2332.

174. Smith D.M., Angus B., Wuthiekanun V., White J.N., (1997), “Arabinose Assimilation Defines a Nonvirulent Biotype of *Burkholderia pseudomallei*”, pp. 4319–21

175. Smith-Vaughan H.C., D. Gal, P. Lawrie, C. Winstanley, K.S. Sriprakash and B.J. Currie, (2003), “Ubiquity of putative type III secretion genes among clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei* isolates in Northern Australia”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41(2), pp. 883-885.

176. Songsri J., Y. Kinoshita, W. Kwanhian, S. Wisessombat, J. Tangpong, M.S. Rahman-Khan and A. Tuanyok, (2018), “Cross-reactivity of latex agglutination assay complicates the identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil”, *FEMS microbiology letters*, Vol. 365(22), pp. 256.

177. Spotnitz M., J. Rudnitzky and J.J. Rambaud, (1967), “Melioidosis pneumonitis: analysis of nine cases of a benign form of melioidosis”, *Jama*, Vol. 202 (10), pp. 950-954.

178. Sprague L.D., Zysk G., Hagen R.M., Meyer H., Ellis J., Anuntagool N., Gauthier Y. and Neubauer H., (2002), “A possible pitfall in the identification of *Burkholderia mallei* using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin fliC gene”, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Vol. 34(3), pp. 231-236.

179. Stanton A. and Fletcher W., (1921), “Melioidosis, a New Disease of the Tropics”, *Melioidosis, a New Disease of the Tropics*. Vol. 69(5), pp. 437-45.

180. Stanton A. and Fletcher W., (1927), “Melioidosis: Notes on a Culture of *B. whitmori* from Saigon”, *Epidemiology & Infection*, Vol. 26(1), pp. 31-32.

181. Steinmetz I., Reganzerowski A., Brenneke B., Häussler S., Simpson A. and White N., (1999), “Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 37(1), pp. 225-228.

182. Steinmetz I., Wagner G.E., Kanyala E., Sawadogo M., Soumeya H., Teferi M.,

Andargie E., Yeshitela B., Yaba L.A. and Sanogo M., (2018), “Melioidosis in Africa: time to uncover the true disease load”, *Tropical medicine and infectious disease*, Vol. 3(2), pp. 62.

183. Stewart T., Engelthaler D.M., Blaney D.D., Tuanyok A., Wangsness E., Smith T.L., Pearson T., Komatsu K.K., Keim P. and Currie B.J., (2011), “Epidemiology and investigation of melioidosis, Southern Arizona”, *Emerging infectious diseases*, Vol. 17(7), pp. 1286.

184. Suebrasri T., Wang-ngarm S., Chareonsudjai P., Sermswan R.W. and Chareonsudjai S., (2013), “Seasonal variation of soil environmental characteristics affect the presence of *Burkholderia pseudomallei* in Khon Kaen, Thailand”, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7(19), pp. 1940-1945.

185. Sullivan R.P., Marshall C.S., Anstey N.M., Ward L. and Currie B.J., (2020), “2020 review and revision of the 2015 Darwin melioidosis treatment guideline; paradigm drift not shift”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 14(9), pp. e0008659.

186. Supaprom C., Wang D., Leelayuwat C., Thaewpia W., Susaengrat W., Koh V., Ooi E.E., Lertmemongkolchai G. and Liu Y., (2007), “Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 45(9), pp. 2894-2901.

187. Suttisunhakul V., Wuthiekanun V., Brett P.J., Khusmith S., Day N.P., Burtnick M.N., Limmathurotsakul D. and Chantratita N., (2016), “Development of rapid enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 54(5), pp. 1259-1268.

188. Teerawattanasook N., Tauran P.M., Teparrukkul P., Wuthiekanun V., Dance D.A., Arif M. and Limmathurotsakul D., (2017), “Capacity and utilization of blood culture in two referral hospitals in Indonesia and Thailand”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 97(4), pp. 1257.

189. Thompson L.R., Sanders J.G., McDonald D., Amir A., Ladau J., Locey K.J., (2017), “A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity”, *Nature*, Vol. 551(7681), pp. 457–63.

190. Tiyawisuttri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P. and Wuthiekanun V., (2005), “Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(9), pp. 4872-4874.
191. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Al Dahouk S., Scholz H.C., Reisinger E.C., Sprague L.D., Rathmann I. and Neubauer H., (2005), “Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes”, *Molecular and cellular probes*, Vol. 19(1), pp. 9-20.
192. Tong S., Yang S., Lu Z. and He W., (1996), “Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei*”, *Microbiology and immunology*, Vol. 40(6), pp. 451-453.
193. Thomas A. and Forbes-Faulkner J., (1981), “Persistence of *Pseudomonas pseudomallei* in soil”, *Australian veterinary journal*, Vol. 57(11), pp. 535-536.
194. Thomas A., Forbes-Faulkner J., and Parker M., (1979), “Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths”, *American journal of epidemiology*, Vol. 110(4), pp. 515-521.
195. Trakulsomboon S., Vuddhakul V., Tharavichitkul P., Na-Gnam N., Suputtamongkol Y., Thamlikitkul V., (2000), “Epidemiology of arabinose assimilation in *Burkholderia pseudomallei* isolated from patients and soil in Thailand”, pp. 756–9.
196. Trung T., Hoang T., Tran D., Trinh V., Göhler A., Nguyen T., Hoang S., Krumkamp R., Nguyen L. and May J., (2018), “A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: A study from north-central Vietnam”, *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 24(1), pp. e81-84.
197. Trung T.T., Assig K., Tran Q.T., Goehler A., Bui L.N., Wiede C., Folli B., Lichtenegger S., Nguyen T.T. and Wagner G.E., (2019), “Erythritol as a single carbon source improves cultural isolation of *Burkholderia pseudomallei* from rice paddy soils”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 13(10), pp. e0007821.

198. Trung T.T., Nguyen L.D., Nguyen T.V., Tran C.X., Le A.V., Nguyen H.V., Assig K., Lichtenegger S., Wagner G.E. and Do C.D., (2018), “Meliodosis in Vietnam: Recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting”, *Tropical Medicine and Infectious Disease*, Vol. 3(2), pp. 39.
199. Trung T.T., Göhler E., Topfstedt E., Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Peacock S.J., and Steinmetz I., (2011), “Highly sensitive detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* in environmental soil samples using real-time PCR”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 77(18), pp. 6486-94.
200. Trung T.T., Hetzer A., Topfstedt E., Göhler A., Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Peacock S.J. and Steinmetz I., (2011), “Improved culture-based detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* from soil”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 105(6), pp. 346-351.
201. Van Phung L., Chi T.T.B., Hotta H., Yabuuchi E. and Yano I., (1995), “Cellular lipid and fatty acid compositions of *Burkholderia pseudomallei* strains isolated from human and environment in Viet Nam”, *Microbiology and immunology*, Vol. 39(2), pp. 105-116.
202. Van Phung L., Quynh H.T., Yabuuchi E. and Dance D.A., (1993), “Pilot study of exposure to *Pseudomonas pseudomallei* in northern Vietnam”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 87(4), pp. 416-416.
203. Van Seventer J.M. and Hochberg N.S., (2017), “Principles of infectious diseases: transmission, diagnosis, prevention, and control”, *International encyclopedia of public health*, Vol. 22, pp. 22-39.
204. Vaucel M. (1937), “Présence probable du bacille de Whitmore dans l’eau de mare au Tonkin”, *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, Vol. 30, pp. 10-15.
205. Vidyalakshmi K., Chakrapani M., Shrikala B., Damodar S., Lipika S. and Vishal S., (2008), “Tuberculosis mimicked by melioidosis”, *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Vol. 12(10), pp. 1209-1215.
206. Vio S.A., García S.S., Casajus V., Arango J.S., Galar M.L., Bernabeu P.R. and

- Luna M.F., (2020), *Paraburkholderia. Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, Elsevier, pp. 271-311.
207. Vongphayloth K., Rattanavong S., Moore C.E., Phetsouvanh R., Wuthiekanun V., Sengdouangphachanh A., Phouminh P., Newton P.N. and Buisson Y., (2012), “*Burkholderia pseudomallei* detection in surface water in southern Laos using Moore's swabs”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 86(5), pp. 872.
208. Vuddhakul V., Tharavichitkul P., Na-Ngam N., Jitsurong S., Kunthawa B., Noimay P., Noimay P., Binla A., Thamlikitkul V., (1999), “Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 60(3), pp. 458-461.
209. Wagner G.E., Förderl-Höbenreich E., Assig K., Lipp M., Berner A., Kohler C., Lichtenegger S., Stiehler J., Karoonboonyanan W. and Thanapattarapairoj N., (2020), “Melioidosis DS rapid test: A standardized serological dipstick assay with increased sensitivity and reliability due to multiplex detection”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 14(7), pp. e0008452.
210. Wang H., Chen Y.L., Teng S.H., Xu Z.P., Xu Y.C. and Hsueh P.R., (2016), “Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinical and Environmental Isolates of *Burkholderia pseudomallei*”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7, pp. 415.
211. Weber D.R., Douglass L.E., Brundage W.G. and Stallkamp T.C., (1969), “Acute varieties of melioidosis occurring in US soldiers in Vietnam”, *The American journal of medicine*, Vol. 46(2), pp. 234-244.
212. White N.J., (1994), “Melioidosis”, *Zentralbl Bakteriologie*, Vol. 280, pp. 439–43.
213. White N. J. (2003. ), “Melioidosis”, *The Lancet*, Vol. 361(9370), pp.1715-1722.
214. Whitmore A. and Krishnaswami C., (1912), “A hitherto undescribed infective disease in Rangoon”, *The Indian medical gazette*, Vol. 47(7), pp. 262.

215. Wiersinga W.J., Currie B.J. and Peacock S.J., (2012), “Melioidosis”, *New England Journal of Medicine*, Vol. 367(11), pp. 1035-1044.
216. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A. and Limmathurotsakul D., (2018), “Melioidosis”, *Nature reviews Disease primers*, Vol. 4(1), pp. 1-22.
217. Wikraiphat C., Saiprom N., Tandhavanant S., Heiss C., Azadi P., Wongsuvan G., Tuanyok A., Holden M.T., Burtnick M.N. and Brett P.J., (2015), “Colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* is associated with antigenic variation and O-polysaccharide modification”, *Infection and immunity*, Vol. 83(5), pp. 2127-2138.
218. Wilson M., Smith S., Brown J. and Hanson J., (2016), “Melioidosis mimicking primary lung malignancy with superior vena cava obstruction”, *IDCases*, Vol. 6, pp. 58.
219. Woods K.L., Boutthasavong L., NicFhogartaigh C., Lee S.J., Davong V., AuCoin D.P., (2018), “Evaluation of a Rapid Diagnostic Test for Detection of *Burkholderia pseudomallei* in the Lao People’s Democratic Republic”, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 56(7), pp. e02002-17.
220. Woo P.C., Leung P.K., Wong S.S., Ho P.L. and Yuen K.Y., (2001), “groEL encodes a highly antigenic protein in *Burkholderia pseudomallei*”, *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol. 8(4), pp. 832-836.
221. Worthington M.G. and McEntry D.W., (1990), “Chronic melioidosis in a Vietnamese immigrant”, *Reviews of infectious diseases*, Vol. 12(5), pp. 966-966.
222. Wuthiekanun V., Chierakul W., Langa S., Chaowagul W., Panpitpat C., Saipan P., Thoujaikong T., Day N.P. and Peacock S.J., (2006), “Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Vol. 74(6), pp. 1074-1075.
223. Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Chantratita N., Feil E.J., Day N.P. and Peacock S.J., (2009), “*Burkholderia pseudomallei* is genetically diverse in agricultural land in Northeast Thailand”, *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 3(8), pp. e496.

224. Wuthiekanun V., Mayxay M., Chierakul W., Phetsouvanh R., Cheng A.C., White, N.J., Day N.P. and Peacock S.J., (2005), "Detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil within the Lao People's Democratic Republic", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(2), pp. 923-924.
225. Wuthiekanun V., Pheaktra N., Putchhat H., Sin L., Sen B., Kumar V., Langla S., Peacock S.J. and Day N.P., (2008), "*Burkholderia pseudomallei* antibodies in children, Cambodia", *Emerging infectious diseases*, Vol. 14(2), pp. 301.
226. Wuthiekanun V., Smith M.D., Dance D.A. and White N.J., (1995), "Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 89(1), pp. 41-43.
227. Wuthiekanun V., Smith M.D. and White N.J., (1995), "Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 89(5), pp. 491-491.
228. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T. and Arakawa M., (1992), "Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov", *Microbiology and immunology*, Vol. 36(12), pp. 1251-1275.
229. Yi J., Simpanya M.F., Settles E.W., Shannon A.B., Hernandez K., Pristo L., et al., (2019), "Caprine humoral response to *Burkholderia pseudomallei* antigens during acute melioidosis from aerosol exposure", *PLoS Negl Trop Dis*, Vol. 13(2). e0006851
230. Zaw K.K., Wasgewatta S.L., Kwong K.K., Fielding D., Heraganahally S.S. and Currie B.J., (2019), "Chronic pulmonary melioidosis masquerading as lung malignancy diagnosed by EBUS guided sheath technique", *Respiratory medicine case reports*, Vol. 28, pp. 100894.
231. Zheng X., Xia Q., Xia L. and Li W., (2019), "Endemic melioidosis in southern China: past and present", *Tropical medicine and infectious disease*, Vol. 4(1), pp. 39.



232. Zhu X., Chen H., Li S., Wang L., Wu D., Wang X., Chen R., Li Z.J. and Liu Z., (2020), “Molecular characteristics of *Burkholderia pseudomallei* collected from humans in Hainan, China”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 11, pp. 778.
233. Zimmermann R.E., Ribolzi O., Pierret A., Rattanavong S., Robinson M.T., Newton P.N., Davong V., Auda Y., Zopfi J. and Dance D.A., (2018), “Rivers as carriers and potential sentinels for *Burkholderia pseudomallei* in Laos”, *Scientific reports*, Vol. 8(1), pp. 1-7.
234. Zong Z., Wang X., Deng Y. and Zhou T., (2012), “Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system”, *Journal of medical microbiology*, Vol. 61(10), pp.1483-1484.
235. Zueter A.R., Rahman Z.A, Abumarzouq M. and Harun A., (2018), “Multilocus sequence types of clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates from peninsular Malaysia and their associations with disease outcomes”, *BMC Infectious Diseases*, Vol. 18, pp. 5

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Trình tự gene BPSS1498, BPSL2697 và BPSL2096 (Holden et al., 2004)

#### >BPSS1498

```
1 atgctggccg gaatatatct caaggtcaaa ggaaaaacc agggggaaat
51 caaaggctcc gtcgttcagg aaggtcatga cgggaaaatc cacatcctcg
101 ccttcaagaa cgactacgac atgcctgcca ggctccagga aggctgacg
151 cccgccgccg ccgctcgcgg cacgatcacg ttgacgaagg aatggacag
201 atcgctgccg caattcctgc aggcgctcgg caagcgcgag atgatggaag
251 agttcgagat cacgatccac cgtccgaaga cggatacaac aggtggggac
301 ctgaccgaac tcctgttcac gtacaagttc gaaaaagtgc tgatcaccca
351 catggaccaa tactcgccca cgccgcacaa agacgatagc aacggcatca
401 aggaaggctt gctcggctat atcgaggaga tcaagttcac gtattcggga
451 tactcgttgg aacacgcgga atcgggcata gcgggcgccg caaactggac
501 gaatggctga
```

#### >BPSL2697

```
1 atggcagcta aagacgtcgt attcggcgat tccgcacgcg cgaagatggt
51 cgaaggcgtg aacattctcg ccaacgctgt gaaggtcacg ctgggtccga
101 agggccgcaa cgtggtgctc gagcgcagct tcggcggccc gacggtcacg
151 aaggacggtg tgtcggtcgc gaaggaaatc gagctgaagg acaagctcca
201 gaacatgggc gcgcagatgg tcaaggaagt cgcttccaag accagcgaca
251 acgccggcga cggcacgacg acggccaccg tcctcgcgca atcgatcgtc
301 cgcgaaggca tgaagtacgt cgcacgggc atgaaccoga tggacctgaa
351 gcgcggcatc gacaaggcag tcgcccgggc agtcgaagag ctgaagaaga
401 tcagcaagcc gtgcacgacg aacaaggaaa tcgcgcaagt cggcgcgacg
451 tcggcgaaca gcgattcgtc gatcggcgat cgcacgctg aagcgatgga
501 caaggctcggc aaggaaggcg tgatcacctg cgaagacggc aagtcgctcg
551 ccgacgagct cgacgtcgtc gaaggcatgc agttcgaccg cggctacctg
601 tcgccgtact tcatcaacaa cccggacaag caagtcgccg tcctcgagaa
651 cccgttcgtg ctgctgcacg acaagaaggc gtcgaacatc cgcgacctgt
701 tgccggtgct cgagcaagtc gcgaaggctg gccgtccgct gctgatcatc
751 gccgaagacg tcgaaggcga agcgtcgcga acgctggtcg tcaacaacat
801 ccgcggcatc ctgaagaccg ttgctggtcaa ggcgccgggc ttcggcgatc
851 gtcgcaaggc gatgctggaa gacatcgcga tcctgacggg cggccaggtc
901 atcgcggaag aaaccggcct cacgctcgag aaggcaacgc tggcagaact
951 gggccaggcg aagcgcacgc aagtgggcaa ggaaaacacg acgatcatcg
```

1001 acggcgcggg cgaagccgtg aacatcgaag cgcgcgtaa gcaaatccgc  
1051 acgcaaactc aagaagcgac atcggactac gaccgtgaaa agctgcaaga  
1101 gcgcggtggc aagctggcag gcggcgtggc ggtgatcaag gttggcgctg  
1151 cgaccgaagt cgaaatgaag gaaaagaagg cacgtgtcga ggacgcgctg  
1201 cacgccaccg gcgctgccgt tgaagaaggc atcgtcccgg gcggcggcgt  
1251 cgcgctgatc cgcgcacgca ccgcatcgc gggcctgacc ggcgtgaacg  
1301 ccgaccagaa cgccggcacc aagatcgtgc tgcgcgcat ggaagagccg  
1351 ctgcgccaga tcgtcacgaa cggcggcgaa gaagcgagcg tcgtggtggc  
1401 ggcagttgct gcgggcaagg gcaactacgg ctacaacgag gcgacgggag  
1451 agtacgtcga catggtcga gcccggcgtc tcgatccgac gaaggtcacc  
1501 cgtaccgagc tgcagaacgc ggcttcgggc gccggcctgc tgctgacgac  
1551 ggacgcagcc gttgccgaac tgccgaagga agacgctccg atgccggggc  
1601 gcatgccggg cggcatgggc ggcatgggca tggacatgta a

>BPSL2096

1 atgaagaccg tgggcgataa actcgaagct ttcaccgttg tggccgcgaa  
51 gccgggcttc aacaatcacg aagaaaacgg ccagtcggca ttcgagaccg  
101 tcaccgaagc gtcggtcccg ggcaagtgga agatcatcta cttctaccgg  
151 aaggacttca cgttcgtctg cccgacggaa atcgtcgaat tcgcgaagct  
201 cgcaagcagc ttcgaagagc gtgacgccgt cctgctcggc ggcagctcgg  
251 acaacgaatt cgtcaagctc gcatggcgcc gtgagcacia ggatctcgac  
301 aagctgaacc actactcgtt cggcgacgtc aagggcgagc tgatcgacca  
351 gctcggcgtg cgcgacaagg aagcgggagc cgcactgcgc gcgaccttca  
401 tcgtcgatcc ggacaacacg atccagcacg tgcggtgaa caacctgaac  
451 gtcggccgca gcccggaaga aatcctgcgc attctcgacg gcctgcaaac  
501 ggacgaactc tgcccgtgca accgcgcgat cggcggcgag acgctgtaa



Sắc ký đồ kết quả giải trình tự của vector nhân dòng cho gen BPSL2697 sử dụng môi gen đặc hiệu cho chiều reverse (Sử dụng phần mềm SnapGene Viewer Version 5.1)



	690	700	710	720	730	820	830	840	850	860	
BPSL2697	GTCGAA	CATCCG	CACCTG	TGCGCG	TGCTCG	AGCAAG	TGCGG	TCAGG	CCCGGG	TCGGCG	ATCGCAAGGCGA
FW-sequencing	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RV-sequencing	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	1050	1060	1070	1080	1090	1130	1140	1150	1160	1170	
BPSL2697	CAAA	TCCG	CACG	CAAT	CGAAG	AGCG	ACTCG	GACTAC	GACCG	TGAAA	AGCTG
FW-sequencing	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RV-sequencing	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

Kết quả so sánh trình tự gen BPSL2697 mã hóa protein GroEL từ chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243 và trình tự gen giải được từ vector nhân dòng sử dụng khuôn DNA của chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 với bốn nucleotide thay đổi nhưng không ảnh hưởng đến mã hóa protein (Sử dụng phần mềm BioEdit version 7.2.5). Codon **TTG**->**CTG** cùng mã hóa cho Leu234, **GCG**->**GCA** cùng mã hóa cho Ala278, **ACA**->**ACG** mã hóa cho Thr357, **GTT**->**GTC** mã hóa cho Val381.

**Phụ lục 3. Tóm tắt dữ liệu lâm sàng và tình trạng xuất viện của 38 bệnh nhân có huyết thanh dương tính với WC/Hcp1-ELISA nhập viện điều trị tại BVĐK tỉnh Hà Tĩnh**

Tuổi/giới tính	Biểu hiện và chẩn đoán	Nuôi cấy sinh sinh*	WC-ELISA (OD <sub>490</sub> ) <sup>†</sup>	Hcp1-ELISA (OD <sub>490</sub> ) <sup>†</sup>	Kháng sinh <sup>‡</sup>	Năm viện (ngày)	Thông tin theo dõi <sup>§</sup>
Nhóm 1: Bệnh nhân được tái khẳng định dương tính với melioidosis (n=2)							
47/Nam	Vết thương nhiễm trùng	Không	1,674 ± 0,004	0,603 ± 0,007	Ampicilin/sulbactam, ofloxacin, và tinidazole	13	Sau khi ra viện, bệnh nhân sốt cao và nhập viện tại BV Bệnh nhiệt đới TW và được xét nghiệm nuôi cấy dương tính với <i>B. pseudomallei</i> . Bệnh nhân đã hồi phục tốt sau khi tiêm kháng sinh đường tĩnh mạch trong 2 tuần và điều trị kháng sinh đường uống trong 2 tháng.
51/Nam	Sốt không rõ nguyên nhân, tiểu đường	Nuôi cấy máu 2 mẫu (-)	0,646 ± 0,029	0,254 ± 0,004	Cefoperazone/sulbactam và metronidazole	9	Sau khi xuất viện, bệnh nhân sốt trở lại, xuất hiện nhiều ổ áp xe da ở chân. Bệnh nhân đã được tái nhập viện và xét nghiệm nuôi cấy phát hiện được <i>B. pseudomallei</i> từ bệnh phẩm mủ. Bệnh nhân đã được điều trị bằng các loại kháng sinh khuyến cáo hiện nay và hồi phục tốt.
Nhóm 2: Bệnh nhân tử vong (n=9)							
74/Nữ	Mệt mỏi	Không	2,145 ± 0,126	0,330 ± 0,005	Cefoperazone/sulbactam và ciprofloxacin	13	Sau khi xuất viện, bệnh nhân nhập viện khác và được chẩn đoán ung thư gan. Bệnh nhân qua đời vào tháng 9/2021.
82/Nữ	Thiếu máu, suy thận	Không	0,631 ± 0,004	0,230 ± 0,015	Không sử dụng kháng sinh	3	Sau khi xuất viện, bệnh nhân nhập viện khác điều trị suy thận. Bệnh nhân qua đời vào tháng 4/2021.
74/Nam	Viêm phổi và bệnh phổi tắc nghẽn mạn	Không	0,423 ± 0,004	0,531 ± 0,008	Cefoperazone/sulbactam, ciprofloxacin, và	9	Bệnh nhân tử vong sau khi ra viện một tuần.

	tính				amikacin		
44/Nam	Xơ gan và suy thận	Không	$0,390 \pm 0,008$	$0,526 \pm 0,004$	Ceftriaxone và ofloxacin	10	Bệnh nhân chuyển nặng và tử vong sau khi ra viện
59/Nam	Viêm phổi, xơ gan, huyết áp cao	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	$1,376 \pm 0,027$	$0,171 \pm 0,001$	Cefoperazone/sulbactam, ceftazidime, và ciprofloxacin	16	Bệnh nhân được chuyển đến một bệnh viện khác ở Hà Nội và được chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi. Tháng 6/2021, bệnh nhân bị viêm phổi nặng tràn dịch màng phổi và tử vong.
43/Nam	Viêm phổi, xơ gan và ung thư gan	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	$0,607 \pm 0,008$	$0,492 \pm 0,018$	Ciprofloxacin	6	Bệnh nhân xuất viện do không đủ điều kiện kinh tế điều trị. Bệnh nhân tử vong tháng 3/2021.
59/Nam	Sốc nhiễm trùng, suy hô hấp và suy thận mạn tính	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	$0,802 \pm 0,056$	$0,413 \pm 0,002$	Cefoperazone/sulbactam, ciprofloxacin, moxifloxacin, và meropenem	25	Sau 10 ngày kể từ ngày ra viện, bệnh nhân tử vong vào tháng 12/2020.
84/Nữ	Viêm phổi và thiếu máu	Nuôi cấy dịch màng phổi (-)	$0,207 \pm 0,000$	$1,211 \pm 0,036$	Cefoperazone/sulbactam, ciprofloxacin, và moxifloxacin	13	Sau khi xuất viện, sức khỏe của bệnh nhân tiến triển xấu và tử vong vào tháng 12/2020.
79/Nữ	Sốc nhiễm trùng và viêm phổi	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-) Nuôi cấy đờm 1 mẫu (-)	$0,665 \pm 0,018$	$0,903 \pm 0,012$	Cefoperazone/sulbactam, ciprofloxacin, amikacin, và ampicilin/sulbactam	3	Sau 9 ngày ra viện, sức khỏe của bệnh nhân ngày càng yếu và tử vong vào tháng 2/2021.
<b>Nhóm 3: Bệnh nhân ốm yếu (n=17)</b>							
74/Nữ	Sốt, tiểu đường và huyết áp cao	Không	$0,610 \pm 0,062$	$0,242 \pm 0,005$	Không có dữ liệu	8	Bệnh nhân thỉnh thoảng bị ho và đau tức ngực
50/Nữ	Ù tai và nhức đầu	Không	$0,650 \pm 0,005$	$0,422 \pm 0,016$	Không có dữ liệu	0	Bệnh nhân thỉnh thoảng bị đau bụng
45/Nam	Viêm phổi, xơ gan,	Không	$0,761 \pm 0,248$	$0,784 \pm 0,012$	Ciprofloxacin	4	Người bệnh thỉnh thoảng cảm thấy mệt mỏi



	nghiện rượu và xuất huyết đường tiêu hóa						
87/Nam	Xơ gan và huyết áp cao	Không	$0,977 \pm 0,057$	$0,385 \pm 0,013$	Ceftriaxone và ciprofloxacin	7	Bệnh nhân bị chướng bụng to
69/Nam	Phù phổi và suy thận mạn tính	Không	$0,512 \pm 0,028$	$0,611 \pm 0,028$	Không có dữ liệu	9	Bệnh nhân mệt mỏi
60/Nam	Xơ gan và nghiện rượu	Không	$0,310 \pm 0,030$	$0,556 \pm 0,025$	Không sử dụng kháng sinh	8	Bệnh nhân mệt mỏi
40/Nam	Xơ gan và nghiện rượu	Không	$0,955 \pm 0,001$	$1,033 \pm 0,058$	Không sử dụng kháng sinh	8	Đến tháng 7/2021, bệnh nhân nhập viện khác do sốt, loét nhiều vùng chân trái và mông
89/Nam	Tiểu đường	Không	$0,621 \pm 0,037$	$0,439 \pm 0,004$	Không có dữ liệu	0	Bệnh nhân thỉnh thoảng cảm thấy mệt mỏi
70/Nam	Viêm phổi và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính	Không	$0,181 \pm 0,006$	$0,568 \pm 0,005$	Cefoperazone/sulbactam	7	Bệnh nhân nhập viện khác và được chẩn đoán ung thư phổi
73/Nam	Suy thận mạn tính	Không	$0,321 \pm 0,013$	$0,635 \pm 0,030$	Không có dữ liệu	0	Bệnh nhân thường xuyên nhập viện để lọc máu
87/Nữ	Tiểu đường	Không	$0,465 \pm 0,009$	$0,530 \pm 0,010$	Không sử dụng kháng sinh	0	Bệnh nhân sau đó nhập viện và được chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi. Bệnh nhân khỏe mạnh sau 6 tháng sử dụng thuốc thảo dược cổ. Hiện tại bệnh nhân bị viêm khớp háng nặng kèm theo sưng đỏ.
76/Nam	Sốc nhiễm trùng và viêm phổi	Không	$0,609 \pm 0,030$	$0,270 \pm 0,012$	Không sử dụng kháng sinh	7	Bệnh nhân đã nhập viện và được chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt.
59/Nam	Sốc nhiễm trùng, nhiễm trùng đường	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	$1,049 \pm 0,011$	$0,207 \pm 0,000$	Cefoperazone/sulbactam	10	Bệnh nhân thường xuyên cảm thấy mệt mỏi.

	tiêu hóa và xơ gan						
68/Nữ	Suy thận mạn tính	Nuôi cấy tiêu (dương tính <i>Proteus mirabilis</i> )	1,128 ± 0,054	0,304 ± 0,000	Cefoperazone/sulbactam và ciprofloxacin	8	Bệnh nhân thườngc nhập viện để điều trị bệnh thận
63/Nam	Viêm phổi và đột quỵ	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-) Nuôi cấy đờm 1 mẫu (-)	0,873 ± 0,021	0,566 ± 0,005	Cefoperazone/sulbactam và tinidazole	9	Bệnh nhân bị đột quỵ và liệt
66/Nam	Viêm phổi và viêm mô tế bào	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-) Nuôi cấy dịch (dương tính <i>Staphylococcus aureus</i> )	0,323 ± 0,012	0,620 ± 0,006	Cefoperazone/sulbactam và vancomycin	10	Bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi vào tháng 5/2021
42/Nam	Viêm phổi và tiêu đường	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	1,800 ± 0,091	1,525 ± 0,004	Cefoperazone/sulbactam và moxifloxacin	11	Sau khi xuất viện, bệnh nhân có cảm giác đau tức ngực và xương khớp. Bệnh nhân thỉnh thoảng bị sốt nhẹ và đổ mồ hôi trộm.
Nhóm 4: Người khỏe mạnh (n=10)							
61/Nam	Viêm phổi và nghi ngờ ung thư phổi	Không	1,001 ± 0,011	0,674 ± 0,002	Không sử dụng kháng sinh	4	
60/Nam	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính	Không	0,637 ± 0,058	0,172 ± 0,004	Cefoperazone/sulbactam và ciprofloxacin	10	
75/Nữ	Viêm phổi	Không	0,231 ± 0,000	0,550 ± 0,008	Moxifloxacin và ampicilin/sulbactam	11	

44/Nam	Sốt và đau đầu	Không	1,733 ± 0,035	0,330 ± 0,010	Không sử dụng kháng sinh	8	
61/Nam	Sốt và đau đầu	Không	0,725 ± 0,058	0,569 ± 0,016	Không có dữ liệu	0	
72/Nam	Tiêu đường	Không	0,366 ± 0,008	0,583 ± 0,002	Không có dữ liệu	0	
65/Nam	Khó thở	Không	0,281 ± 0,021	0,728 ± 0,001	Không sử dụng kháng sinh	0	
81/Nữ	Tiêu đường	Không	0,644 ± 0,011	0,318 ± 0,002	Không có dữ liệu	0	
89/Nữ	Viêm phổi và tiêu đường	Không	0,717 ± 0,032	0,557 ± 0,007	Không sử dụng kháng sinh	0	
70/Nữ	Viêm đa khớp	Nuôi cấy máu 1 mẫu (-)	0,678 ± 0,048	0,304 ± 0,007	Cefoperazone/sulbactam, ciprofloxacin, và levofloxacin	12	

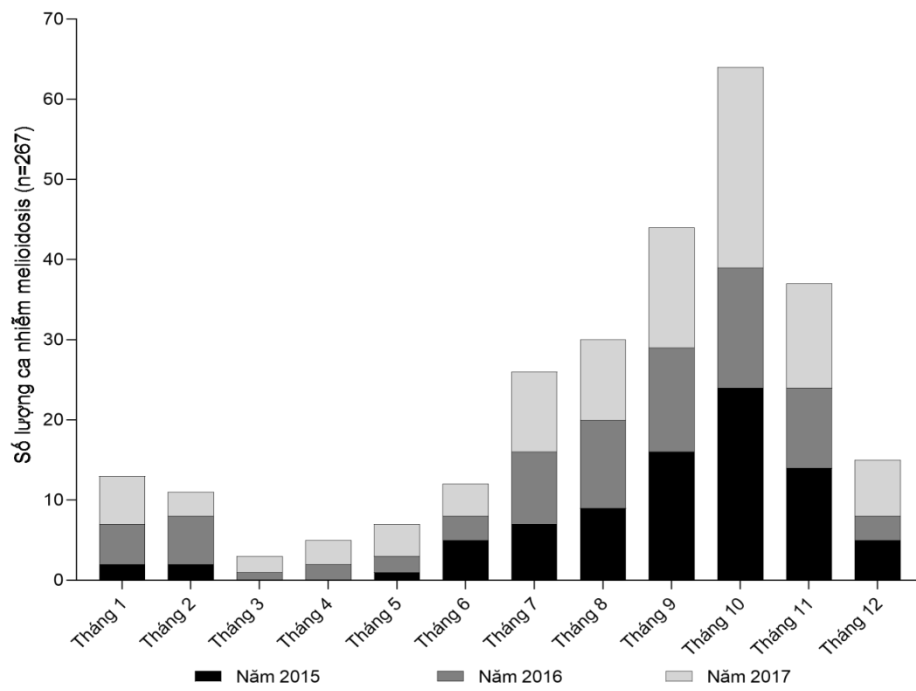
\*Thông tin nuôi cấy vi sinh trong thời gian nhập viện.

†Data are presented as mean ± standard deviation.

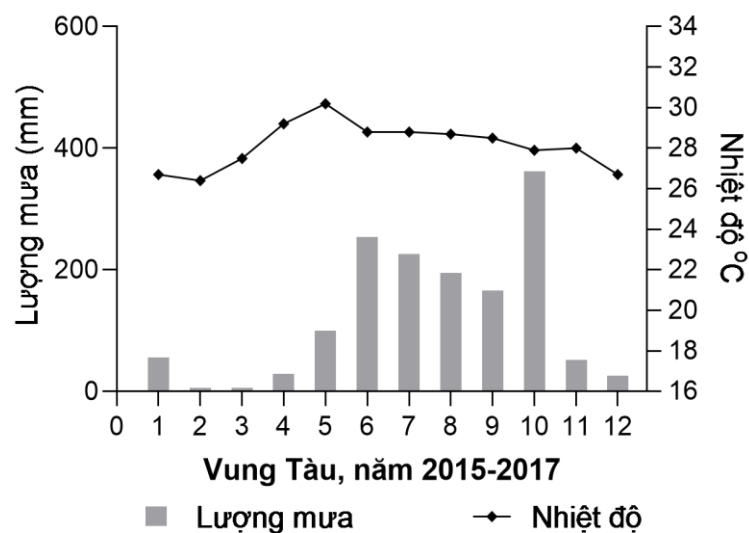
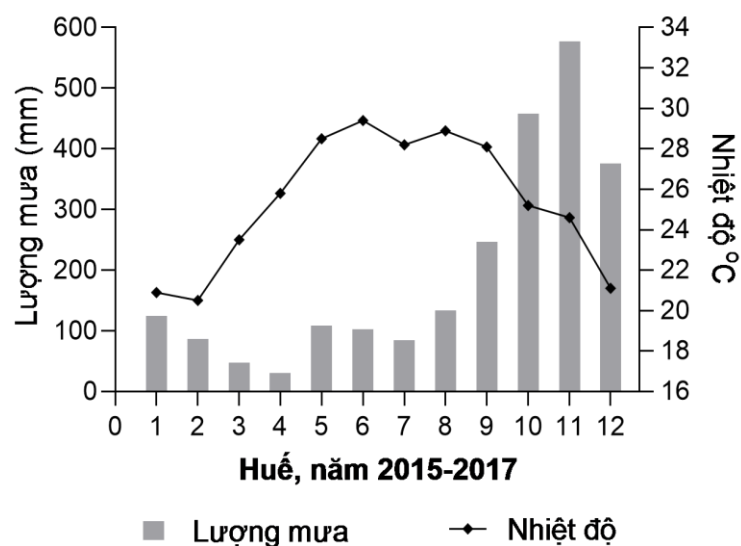
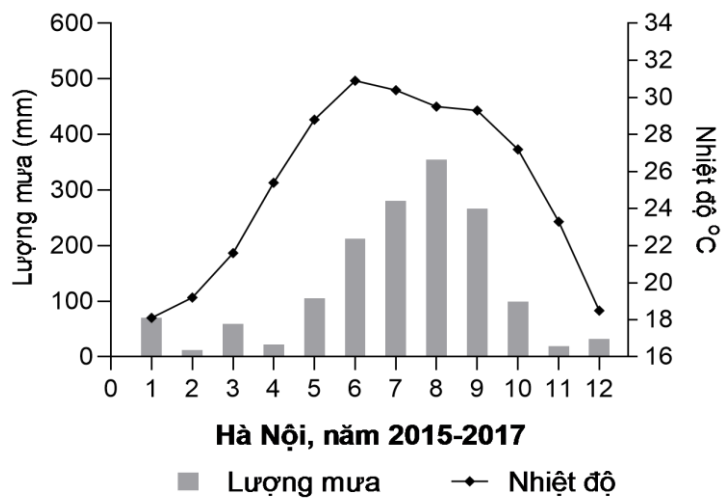
‡Sử dụng kháng sinh khi nằm viện.

§Thông tin được thu bằng cách gọi điện trực tiếp cho bệnh nhân hoặc người nhà.

**Phụ lục 4.** Số lượng ca nhiễm melioidosis ở Việt Nam ghi nhận từ tháng 01/2015-12/2017



**Phụ lục 5.** Biểu đồ nhiệt độ và lượng mưa trung bình ở Hà Nội, Huế và Vũng Tàu năm 2015-2017 (<https://www.gso.gov.vn/so-lieu-thong-ke/>).



**Phụ lục 6. Một số hình ảnh ruộng lúa tại các thời điểm thu mẫu nước**



**Phụ lục 7.** Phân tích đa hình các kiểu gen của các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phân lập tại Triệu Sơn-Thanh Hóa

STT	Chủng	Loài	ace	glxB	gmhD	lepA	lipA	narK	ndh	ST
1	TS 108.3	<i>B. pseudomallei</i>	3	4	11	3	5	1	1	543
2	2TS 36P.1	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
3	4TS 36P.1	<i>B. pseudomallei</i>	3	4	2	3	5	4	1	541
4	5TS*36P	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
5	8TS 36P	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
6	9TS 36P	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
7	2TS 3T.1	<i>B. pseudomallei</i>	3	4	11	3	5	1	1	543
8	2TS 37P.1	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	3	1	1	4	1	533
9	7TS 29P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
10	7TS 35P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
11	7TS 36P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
12	7TS 37P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
13	8TS 8P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	3	1	1	4	1	533
14	8TS 39P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
15	9TS 19P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	6	2	5	48	1	ST mới
16	9TS 26P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	3	1	11	3	6	22	3	542
17	9TS 27P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	3	1	11	3	6	22	3	542
18	9TS 28P(T)	<i>B. pseudomallei</i>	3	1	11	3	6	22	3	542
19	9TS 9T(T)	<i>B. pseudomallei</i>	1	12	3	1	1	4	1	533
20	9TS 27T(T)	<i>B. pseudomallei</i>	3	1	11	3	6	22	3	542
21	9TS 28T(T)	<i>B. pseudomallei</i>	3	1	11	3	6	22	3	542

**Phụ lục 8. Sơ đồ phân bố ST tại một số điểm lấy mẫu nước ruộng lúa**

					29P STmới <sup>7T</sup>	28P ST 542 <sup>9T</sup>							9T ST533 <sup>9T</sup>
						28T ST 542 <sup>9T</sup>					8P ST 533 <sup>8T</sup>		
	35P STmới <sup>7T</sup>			27P ST 542 <sup>9T</sup>	26P ST 542 <sup>9T</sup>								
	36P STmới <sup>7T</sup> STmới <sup>2,5',8,9*</sup> ST541 <sup>4*</sup>			27T ST 542 <sup>9T</sup>									
39P STmới <sup>8T</sup>	37P STmới <sup>7T</sup> ST 533 <sup>2*</sup>												
							19P STmới <sup>9</sup>		3T ST 543 <sup>2*</sup>				

\* chủng phân lập từ dịch làm giàu

<sup>T</sup> chủng phân lập trực tiếp

<sup>2-9</sup> tháng phân lập



**Phụ lục 9.** Hình ảnh giếng khoan liên quan đến cái chết của 3 trẻ em do melioidosis.

A) Quang cảnh khu vực xung quanh giếng khoan. Miệng giếng khoan nằm dưới mặt đất bên trong tường xây khoảng 80 cm. Mũi tên màu đỏ chỉ ra các vết nứt trên tường xây có thể tạo điều kiện cho nước mưa và đất chui vào khu vực miệng giếng khoan.

B) Nhìn từ trên lỗ khoan. Mũi tên màu đỏ cho biết miệng giếng khoan không được đậy kín, có thể cho phép nước mưa và đất chảy vào mạch nước ngầm trong mùa mưa.



**Phụ lục 10.** Các chỉ số hóa lý của các mẫu nước giếng thu từ giếng A nhiễm vi khuẩn *B. pseudomallei* và các giếng khác

STT	Chỉ số hóa lý	Giếng A nhiễm <i>B. pseudomallei</i> (n=1)	Các giếng khác (n=13)*
1	pH	3,91	6,13 (3,98 – 7,19)
2	Tổng số chất rắn lơ lửng (mg/L)	2,47	1,35 (0,85 – 2,67)
3	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	ND	0,14 (ND – 0,4)
4	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	4,80	3,08 (0,22 – 4,54)
5	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	ND	0,21 (ND – 0,23)
6	Fe (mg/L)	0,34	0,19 (0,11 – 0,30)
7	Tổng số carbon hữu cơ (mg/L)	4,70	3,31 (2,50 – 4,20)
8	COD (mg/L)	6,00	5,50 (4,00 – 8,00)
9	BOD (mg/L)	1,00	0,75 (0,00 – 2,00)

\* Median (khoảng). ND: không phát hiện.

**Phụ lục 11. Các chỉ số hóa lý của đất vườn và đất ruộng\***

Chỉ số hóa lý	Đất vườn			Đất ruộng lúa		
	Dương tính (n=14)	Âm tính (n=4)	Giá trị P	Dương tính (n=4)	Âm tính (n=10)	Giá trị P
pH <sub>KCl</sub>	3,73±0,16	3,59±0,11	0,139	4,08±0,24	4,46±0,37	0,087
Độ ẩm (%)	14,30±2,07	16,1±2,52	0,167	18,10±0,15	16,50±3,6	0,395
Độ dẫn điện (μS/cm)	75,48±25,93	112,60±42,92	0,043	105,50±53,17	98,25±44,73	0,798
Carbon hữu cơ (%)	0,99±0,19	0,98±0,47	0,935	0,76±0,40	0,66±0,39	0,673
Nitơ tổng số (%)	0,06±0,01	0,05±0,03	0,458	0,05±0,02	0,05±0,02	0,741
Tổng số P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0,05±0,01	0,06±0,04	0,385	0,07±0,03	0,06±0,03	0,633
Fe (g/Kg)	2,18±0,52	2,46±0,60	0,368	2,15±1,31	1,96±2,46	0,889
Tổng số K <sub>2</sub> O (%)	1,48±0,49	0,57±0,28	0,003	0,96±0,17	0,72±0,26	0,115
Al (g/Kg)	4,75±0,59	3,95±0,49	0,026	2,27±1,35	1,94±0,80	0,571

\* Mean ± SD; giá trị P

**Phụ lục 12.** Đánh giá độ pha loãng huyết thanh và tín hiệu đọc OD<sub>490nm</sub> trong xét nghiệm Hcp1-ELISA

Hệ số pha loãng huyết thanh (lần)												Mẫu huyết thanh
500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000	1024000	
2,362	2,307	2,273	2,257	2,207	2,152	2,122	1,885	1,875	1,557	1,040	0,639	Huyết thanh melioidosis
2,250	2,143	2,109	1,981	1,834	1,581	1,154	0,673	0,450	0,259	0,169	0,128	
2,337	2,289	2,312	2,136	1,772	1,244	0,770	0,455	0,272	0,170	0,122	0,107	
2,327	2,309	2,349	2,340	2,264	2,257	2,099	2,124	1,899	1,682	1,684	1,361	
1,846	1,821	1,776	1,752	1,686	1,523	1,045	0,595	0,249	0,119	0,070	0,062	
1,816	1,760	1,696	1,636	1,353	0,918	0,507	0,279	0,161	0,099	0,067	0,059	
1,852	1,749	1,602	1,300	0,995	0,608	0,341	0,175	0,100	0,066	0,050	0,052	
1,451	1,132	0,756	0,496	0,281	0,174	0,109	0,076	0,059	0,050	0,048	0,057	
1,786	1,696	1,663	1,522	1,229	0,758	0,443	0,248	0,125	0,089	0,073	0,067	
1,778	1,833	1,812	1,798	1,665	1,682	1,551	1,528	1,177	0,640	0,520	0,302	
1,688	1,847	1,771	1,792	1,507	1,662	1,659	1,510	1,267	0,894	0,597	0,369	
1,688	1,731	1,660	1,600	1,455	1,305	0,950	0,544	0,296	0,174	0,119	0,085	
2,079	1,948	1,926	1,843	1,694	1,336	0,888	0,536	0,320	0,187	0,125	0,106	
2,147	2,118	1,940	2,016	1,949	1,760	1,504	1,115	0,698	0,429	0,260	0,188	
2,345	2,270	2,287	2,261	2,077	1,890	1,456	0,933	0,594	0,356	0,237	0,168	
2,024	2,131	1,992	1,953	1,849	1,536	1,160	0,754	0,453	0,285	0,185	0,131	
1,981	1,992	1,819	1,913	1,747	1,912	1,638	1,357	0,988	0,651	0,394	0,296	
2,389	2,286	2,108	1,831	1,349	0,889	0,550	0,328	0,199	0,139	0,104	0,083	
2,401	2,455	2,440	2,313	2,034	1,672	1,323	0,866	0,518	0,308	0,196	0,133	
2,075	1,704	1,177	0,798	0,501	0,303	0,200	0,127	0,097	0,077	0,071	0,064	
2,486	2,334	2,272	2,208	2,035	1,810	1,543	1,055	0,653	0,395	0,256	0,231	
2,505	2,433	2,312	2,243	1,994	1,687	1,690	1,054	0,942	0,680	0,333	0,261	
1,812	1,454	1,087	0,791	0,503	0,310	0,184	0,117	0,091	0,074	0,065	0,066	
2,707	2,647	2,674	2,577	2,391	1,974	1,359	0,838	0,465	0,272	0,168	0,120	
2,682	2,327	1,808	1,187	0,673	0,395	0,239	0,149	0,105	0,083	0,071	0,063	
0,931	0,689	0,471	0,294	0,203	0,141	0,102	0,082	0,068	0,063	0,059	0,057	
2,644	2,581	2,547	2,489	2,354	2,203	1,682	1,187	0,746	0,404	0,229	0,165	
2,015	1,479	1,015	0,668	0,394	0,238	0,152	0,108	0,082	0,073	0,064	0,059	
2,396	2,323	2,267	2,262	2,182	1,898	1,409	0,896	0,517	0,316	0,210	0,169	
2,380	2,284	2,190	1,878	1,345	0,853	0,464	0,274	0,182	0,137	0,111	0,123	
2,104	1,634	1,242	0,776	0,453	0,265	0,185	0,136	0,115	0,127	0,105	0,107	
2,087	1,644	1,158	0,809	0,505	0,304	0,190	0,148	0,121	0,110	0,106	0,107	
1,231	0,920	0,589	0,349	0,218	0,130	0,087	0,065	0,055	0,049	0,047	0,050	
0,987	0,605	0,423	0,256	0,154	0,102	0,071	0,057	0,052	0,047	0,045	0,047	
1,496	1,246	1,029	0,770	0,569	0,390	0,255	0,172	0,103	0,066	0,063	0,065	
1,598	1,490	1,230	0,957	0,658	0,465	0,324	0,219	0,137	0,086	0,080	0,070	
1,288	1,053	0,639	0,383	0,256	0,163	0,094	0,073	0,065	0,054	0,059	0,056	
0,982	0,714	0,453	0,275	0,174	0,118	0,087	0,070	0,062	0,056	0,056	0,060	
												Huyết thanh nhiễm khuẩn khác

1,073	0,797	0,505	0,301	0,184	0,123	0,090	0,071	0,063	0,057	0,057	0,056
1,083	0,879	0,608	0,433	0,257	0,195	0,136	0,096	0,076	0,066	0,058	0,060
1,800	1,466	1,041	0,646	0,387	0,231	0,139	0,091	0,068	0,059	0,052	0,048
0,931	0,641	0,419	0,256	0,155	0,101	0,070	0,056	0,051	0,046	0,049	0,045
1,323	0,950	0,656	0,413	0,247	0,151	0,102	0,073	0,060	0,050	0,046	0,045
1,044	0,699	0,409	0,241	0,139	0,096	0,071	0,056	0,042	0,048	0,045	0,045
1,170	0,789	0,437	0,252	0,134	0,088	0,063	0,052	0,047	0,046	0,042	0,044
1,167	0,819	0,502	0,292	0,163	0,111	0,077	0,061	0,050	0,047	0,043	0,045
0,710	0,455	0,275	0,157	0,100	0,070	0,056	0,048	0,045	0,047	0,043	0,045
1,512	1,251	0,846	0,557	0,349	0,216	0,143	0,095	0,077	0,065	0,059	0,057
0,980	0,672	0,425	0,251	0,172	0,115	0,084	0,068	0,061	0,060	0,056	0,058
1,216	0,864	0,632	0,426	0,279	0,185	0,113	0,084	0,075	0,062	0,057	0,059
1,464	1,068	0,759	0,501	0,308	0,195	0,129	0,095	0,077	0,076	0,068	0,061
1,666	1,236	0,821	0,526	0,324	0,216	0,140	0,103	0,079	0,071	0,067	0,060
0,894	0,576	0,358	0,219	0,150	0,105	0,079	0,070	0,063	0,063	0,061	0,057
1,466	1,123	0,717	0,454	0,275	0,173	0,111	0,084	0,068	0,064	0,061	0,060
1,572	1,123	0,762	0,458	0,271	0,169	0,111	0,082	0,068	0,061	0,061	0,077
1,106	0,748	0,481	0,309	0,196	0,132	0,095	0,075	0,065	0,060	0,058	0,062
0,729	0,485	0,315	0,213	0,135	0,098	0,076	0,065	0,060	0,059	0,059	0,058
1,747	1,365	0,969	0,658	0,402	0,253	0,163	0,134	0,117	0,113	0,106	0,105
1,007	0,672	0,454	0,307	0,214	0,161	0,139	0,118	0,115	0,108	0,107	0,106
1,478	1,074	0,791	0,552	0,332	0,217	0,158	0,132	0,130	0,116	0,110	0,114
0,516	0,336	0,275	0,207	0,155	0,129	0,122	0,109	0,112	0,108	0,108	0,107
1,137	0,754	0,530	0,387	0,265	0,187	0,148	0,136	0,121	0,119	0,112	0,115
0,989	0,761	0,473	0,280	0,169	0,122	0,072	0,061	0,050	0,047	0,043	0,047
0,487	0,323	0,239	0,170	0,105	0,089	0,059	0,058	0,053	0,048	0,051	0,057
1,096	0,878	0,666	0,469	0,284	0,180	0,115	0,082	0,067	0,057	0,055	0,060
0,823	0,628	0,432	0,270	0,181	0,118	0,088	0,071	0,059	0,054	0,055	0,055
0,903	0,726	0,522	0,358	0,220	0,139	0,101	0,076	0,063	0,056	0,051	0,055
0,920	0,717	0,461	0,287	0,178	0,128	0,089	0,068	0,059	0,055	0,051	0,053
0,931	0,747	0,511	0,409	0,270	0,157	0,113	0,083	0,067	0,058	0,056	0,053
0,851	0,705	0,556	0,391	0,263	0,164	0,109	0,080	0,065	0,055	0,052	0,051
0,892	0,560	0,333	0,190	0,108	0,076	0,058	0,050	0,045	0,044	0,043	0,043
1,175	0,815	0,482	0,268	0,152	0,105	0,074	0,060	0,052	0,048	0,046	0,047
0,836	0,549	0,355	0,221	0,139	0,098	0,071	0,058	0,050	0,047	0,046	0,047
1,465	1,198	0,740	0,427	0,246	0,151	0,095	0,068	0,057	0,055	0,050	0,049
2,100	1,764	1,183	0,766	0,463	0,271	0,172	0,109	0,083	0,065	0,060	0,057
1,468	1,205	0,886	0,591	0,370	0,213	0,137	0,076	0,064	0,059	0,054	0,057
0,959	0,684	0,452	0,256	0,172	0,125	0,088	0,071	0,061	0,055	0,054	0,052
1,011	0,755	0,508	0,363	0,225	0,125	0,092	0,062	0,059	0,057	0,057	0,055
1,252	0,868	0,610	0,379	0,249	0,157	0,114	0,080	0,069	0,063	0,061	0,060
0,941	0,677	0,433	0,258	0,161	0,107	0,078	0,061	0,057	0,052	0,052	0,051
1,529	1,185	0,814	0,558	0,340	0,211	0,157	0,100	0,077	0,063	0,059	0,053
1,237	0,845	0,539	0,321	0,189	0,120	0,088	0,067	0,058	0,055	0,052	0,050
1,692	1,275	0,908	0,550	0,359	0,225	0,149	0,103	0,079	0,080	0,064	0,063

Huyết  
thanh  
người  
khỏe mạnh

0,996	0,678	0,448	0,274	0,174	0,123	0,093	0,076	0,069	0,065	0,062	0,061	
1,266	0,945	0,658	0,401	0,241	0,160	0,110	0,084	0,069	0,064	0,060	0,057	
1,638	1,334	0,977	0,654	0,429	0,278	0,191	0,141	0,116	0,132	0,104	0,111	
1,268	0,917	0,701	0,530	0,349	0,233	0,167	0,126	0,109	0,101	0,101	0,099	
1,557	1,185	0,946	0,655	0,405	0,256	0,166	0,135	0,112	0,107	0,106	0,106	
1,088	0,801	0,689	0,441	0,291	0,200	0,154	0,140	0,121	0,116	0,110	0,108	
1,487	1,105	0,887	0,634	0,376	0,232	0,167	0,143	0,123	0,120	0,110	0,116	
1,348	1,038	0,921	0,653	0,402	0,257	0,187	0,144	0,131	0,124	0,105	0,105	

**Phụ lục 13.** Giá trị nồng độ pha loãng (titers) của các mẫu huyết thanh xét nghiệm Hcp1-ELISA chẩn đoán melioidosis

