

**UBND THÀNH PHỐ HÀ NỘI
TRƯỜNG CAO ĐẲNG Y TẾ HÀ NỘI**

GIÁO TRÌNH

*(Ban hành kèm theo Quyết định số: /QĐ-... ngàytháng....
năm..... của)*

MÔ ĐUN: VI SINH

NGÀNH: KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM Y HỌC

TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

Hà Nội, năm

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

LỜI GIỚI THIỆU

Giới thiệu xuất xứ của giáo trình, quá trình biên soạn, mối quan hệ của giáo trình với chương trình đào tạo và cấu trúc chung của giáo trình.

Lời cảm ơn của các cơ quan liên quan, các đơn vị và cá nhân đã tham gia.

....., ngàytháng.....năm.....

THAM GIA BIÊN SOẠN

1. Chủ biên ThS. Hà Thị Nguyệt Minh

2. TS. Bùi Huy Tùng

MỤC LỤC

MÔ ĐUN SỐ 23: VI SINH	6
PHẦN LÝ THUYẾT	10
Bài 1. ĐẠI CƯƠNG VI KHUẨN VÀ VIRUS	10
Bài 2. ĐẠI CƯƠNG MIỄN DỊCH VI SINH VẬT	40
Bài 3. KHÁNG SINH VỚI VI KHUẨN VÀ SỰ KHÁNG KHÁNG SINH	63
Bài 4. VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN, VI HỆ BÌNH THƯỜNG	70
Bài 5. CẦU KHUẨN GÂY BỆNH	77
Bài 6. TRỰC KHUẨN GÂY BỆNH	95
Bài 7. XOẢN KHUẨN GÂY BỆNH.....	122
Bài 8. VI KHUẨN NỘI BÀO	128
Bài 9. VIRUS LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG HÔ HẤP.....	137
Bài 10. VIRUS LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TIÊU HÓA.....	143
Bài 11. VIRUS ĐẠI (Rabies virus).....	147
Bài 12. VIRUS DENGUE (<i>Dengue virus</i>).....	151
Bài 13. CÁC VIRUS VIÊM GAN (<i>Hepatitis viruses</i>)	154
Bài 14. VIRUS GÂY HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH Ở NGƯỜI (HIV)	159
Bài 15. HUMAN PAPILLOMA VIRUS	162
PHẦN THỰC HÀNH	165
Bài 16. KỸ THUẬT PHA CHẾ MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN.....	165
Bài 17. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	199
Bài 18. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN <i>STREPTOCOCCUS</i>	216
Bài 19. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN CẦU KHUẨN GRAM ÂM: LẬU CẦU.....	234
Bài 20. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TRỰC KHUẨN LAO	240
Bài 21. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TRỰC KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT	248
BÀI 22. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	257
Bài 23. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	266
Bài 24. KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH TÍNH.....	274
Bài 25. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN VIRUS BẰNG TEST NHANH CHẨN ĐOÁN	285

MÔ ĐUN SỐ 23: VI SINH

Mã mô đun: MĐXN12.23

Thời gian thực hiện: 105 giờ

- Lý thuyết: 43 giờ
- Thực hành: 58 giờ
- Kiểm tra: 4 giờ

I. Vị trí, tính chất của mô đun

- Vị trí: Là mô đun chuyên ngành bắt buộc trong chương trình đào tạo ngành Kỹ thuật xét nghiệm y học trình độ cao đẳng
- Tính chất: là mô đun bắt buộc, cung cấp cho sinh viên các kiến thức và kỹ năng cơ bản về các loại vi khuẩn, virus gây bệnh thường gặp và các kỹ thuật chẩn đoán nhằm mục đích phục vụ cho việc điều trị và phòng bệnh.

II. Mục tiêu mô đun

*** Kiến thức**

- Trình bày được đặc điểm về hình thể, kích thước, cấu trúc, sinh lý và di truyền của vi khuẩn, virus.
- Trình bày được khái niệm, đặc điểm cơ bản và ứng dụng về quá trình đáp ứng miễn dịch của cơ thể với vi sinh vật gây bệnh
- Phân tích được mối liên hệ giữa đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh của vi khuẩn, virus gây bệnh thường gặp.
- Trình bày được tiêu chuẩn chẩn đoán của 1 số vi khuẩn, virus gây bệnh thường gặp.
- Trình bày được nguyên tắc lấy bệnh phẩm xét nghiệm vi sinh

*** Kỹ năng**

- Lấy được một số bệnh phẩm để làm xét nghiệm vi sinh.
- Thực hiện được quy trình nuôi cấy, định danh được một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Thực hiện được quy trình làm kháng sinh đồ với 1 số vi khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Thực hiện được quy trình chẩn đoán 1 số virus gây bệnh thường gặp bằng test nhanh xác định kháng nguyên và kháng thể.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm

y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực trong khi thực hiện xét nghiệm.

III. Nội dung mô đun

Nội dung tổng quát và phân bổ thời gian mô đun

T T	Tên chương/bài	Thời gian (giờ)			
		TS	LT	TH	KT
1	Đại cương vi khuẩn và virus	4	4		
2	Đại cương miễn dịch vi sinh vật	3	3		
3	Kháng sinh với vi khuẩn và sự kháng kháng sinh	2	2		
4	Vi sinh vật trong tự nhiên, vi hệ bình thường	1	1		
5	Cầu khuẩn gây bệnh	5	5		
6	Trực khuẩn gây bệnh	10	10		
	Kiểm tra	1			1
7	Xoắn khuẩn gây bệnh	2	2		
8	Vi khuẩn nội bào	2	2		
9	Virus lây truyền qua đường hô hấp	5	5		
10	Virus lây truyền qua đường tiêu hóa	2	2		
11	Virus dại (<i>Rabies virus</i>)	1	1		
12	Virus Dengue (<i>Dengue virus</i>)	2	2		
13	Virus viêm gan (<i>Hepatitis viruses</i>)	2	2		
14	Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người	1	1		
15	<i>Human Papilloma Virus</i>	1	1		
	Kiểm tra	1			1
16	Kỹ thuật pha chế môi trường nuôi cấy vi khuẩn	5		5	
17	Kỹ thuật chẩn đoán <i>Staphylococcus</i>	10		10	
18	Kỹ thuật chẩn đoán <i>Streptococcus</i>	5		5	
19	Kỹ thuật chẩn đoán cầu khuẩn gram âm: lậu cầu	2		2	
20	Kỹ thuật chẩn đoán trực khuẩn lao	3		3	
21	Kỹ thuật chẩn đoán họ trực khuẩn đường ruột	10		10	
22	Kỹ thuật chẩn đoán <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5		5	

23	Kỹ thuật chẩn đoán Hemophilus Influenzae	5		5	
24	Kỹ thuật kháng sinh đồ định tính	10		10	
25	Kỹ thuật chẩn đoán virus bằng test nhanh	3		3	
	Kiểm tra	2			2
	Tổng số	105	43	58	4

IV. Nội dung và phương pháp đánh giá

4.1. Nội dung

Kiến thức: kiểm tra nội dung đã học bằng bộ công cụ lượng giá, câu hỏi tự luận.

Kỹ năng: Kiểm tra thực hành tại phòng thực hành chuyên dụng, sử dụng thang điểm Năng lực tự chủ, trách nhiệm: đánh giá thái độ thông qua việc sinh viên thực hiện kỹ năng.

4.2. Phương pháp

Nội dung	Hệ số 1	Hệ số 2	Thi
LT	x		x
TH		x	
Hình thức	Trắc nghiệm/ tự luận	Thực hành/ tự luận	Thực hành/ vấn đáp
Số lượng	2	2	1
Trọng số	40%		60%

4.3. Đánh giá kết thúc mô đun

Nội dung: đánh giá đồng thời kiến thức, kỹ năng và thái độ.

Phương pháp: Thi thực hành.

V. Tài liệu học tập

Tài liệu giảng dạy:

- Bộ y tế (2007), Vi sinh y học - Sách đào tạo Cao đẳng xét nghiệm, NXB Y học.
- Bộ môn Vi Ký sinh, Trường Cao đẳng Y tế Hà Nội (2012), Giáo trình vi sinh tập 1+2, NXB y học.

Tài liệu tham khảo

- Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh (2014), Giáo trình vi sinh y học. NXB Y học.
- Bộ Y tế (2008) Vi sinh vật học. NXB Y học.
- Bộ Y tế (2007) Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng, NXBYH.
- Bộ môn Vi sinh – ĐHY Hà Nội (2013), Thực tập vi sinh y học, NXBYH.
- Bộ môn Vi sinh – ĐHY Hà Nội (2010), Vi sinh y học, NXBYH.

- Lê Huy Chính và CS (2006), Sổ tay vi sinh y học, NXBYH.

PHẦN LÝ THUYẾT

Bài 1. ĐẠI CƯƠNG VI KHUẨN VÀ VIRUS

MỤC TIÊU

* Kiến thức

- Trình bày được hình thể và kích thước của vi khuẩn và virus.
- Trình bày được các thành phần cấu trúc chung và riêng của vi khuẩn và virus.
- Trình bày được quá trình chuyển hoá, hô hấp, sinh sản và phát triển của vi khuẩn.
- Giải thích được 6 giai đoạn nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ
- Trình bày được tính chất của đột biến và ứng dụng trong việc sử dụng kháng sinh.
- Phân tích được vai trò của plasmid và transposon với sự lan truyền gen đề kháng ở vi khuẩn.
- Trình bày được đặc điểm, phân loại và ứng dụng của phage.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Vi khuẩn

1.1. Định nghĩa

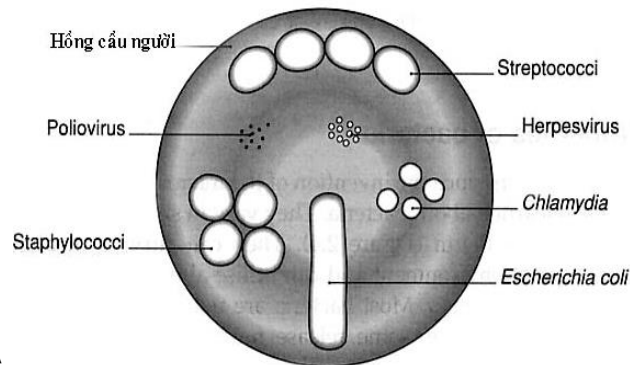
Vi khuẩn là những sinh vật đơn bào, không có màng nhân (Procaryote). Chúng có cấu trúc và hoạt động đơn giản hơn nhiều so với các tế bào có màng nhân (Eucaryote). Tuy nhiên có một vài cơ quan (như vách tế bào) hay chức năng di truyền và sự vận chuyển di truyền phức tạp không kém sinh vật phát triển.

1.2. Hình thể và kích thước

Mỗi loại vi khuẩn có hình dạng và kích thước nhất định. Các hình dạng và kích thước này là do vách của tế bào vi khuẩn quyết định. Bằng các phương pháp nhuộm và soi kính hiển vi người ta có thể xác định được hình thể và kích thước của vi khuẩn... Để xác định vi khuẩn, hình thể là một tiêu chuẩn rất quan trọng, mặc dù phải kết hợp với các đặc điểm sinh học khác (tính chất hoá sinh học, kháng nguyên và khả năng gây bệnh). Trong một số trường hợp nhất định, dựa vào hình thể vi khuẩn kết hợp với

dấu hiệu lâm sàng người ta có thể chẩn đoán được bệnh.

Kích thước vi khuẩn được đo bằng micromet ($1\mu\text{m} = 1/1000\text{ mm}$). Kích thước của các loại vi khuẩn khác nhau thì không giống nhau và kích thước của một loại vi khuẩn cũng phụ thuộc vào điều kiện tồn tại của chúng.



Hình

sinh vật

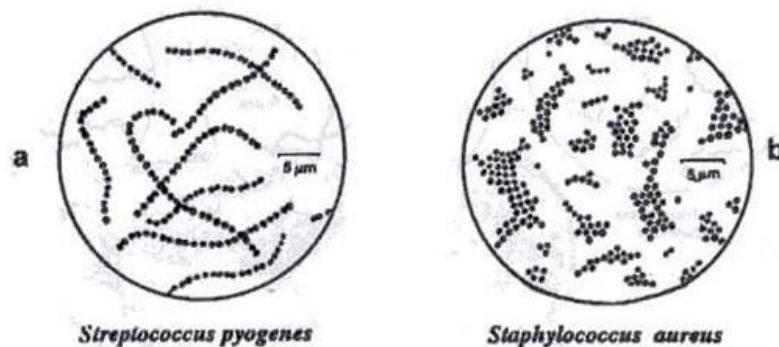
Tế bào hồng cầu người $15-20\mu\text{m}$, *Staphylococci* $1\mu\text{m}$, *E. coli* $1 \times 5\mu\text{m}$,

Poliovirus 30 nm , *Herpesvirus* 100 nm

Về hình thể, người ta chia vi khuẩn làm 3 loại lớn:

- Cầu khuẩn (Cocci):

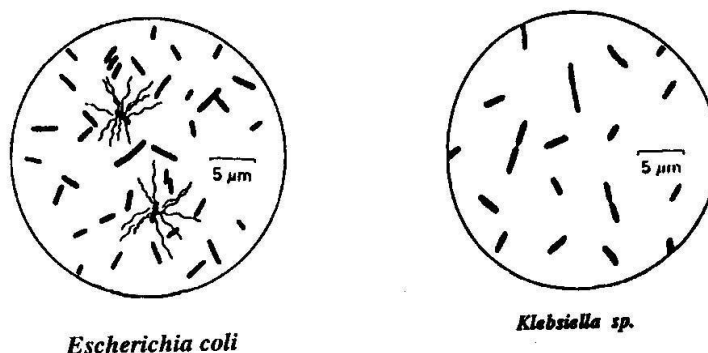
Cầu khuẩn là những vi khuẩn có hình cầu, chúng có thể là những hình tròn, nhưng cũng có thể là hình bầu dục hoặc ngọn nến. Đường kính trung bình khoảng $1\mu\text{m}$. Cầu khuẩn lại được chia làm nhiều loại như: đơn cầu, song cầu, tứ cầu, tụ cầu và liên cầu.



Hình 1.2. Hình thể một số cầu khuẩn

- Trục khuẩn (Bacilli)

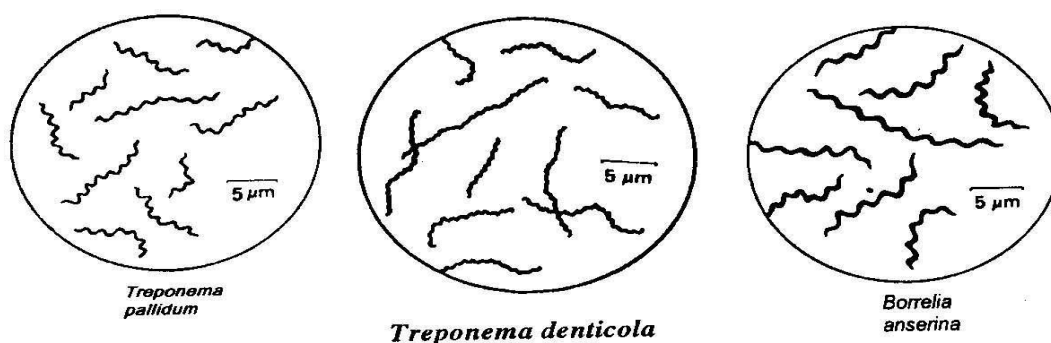
Trục khuẩn là những vi khuẩn hình que, đầu tròn hay vuông, kích thước của các vi khuẩn gây bệnh thường gặp là bề rộng $1\mu\text{m}$, chiều dài $2-5\mu\text{m}$. Các trục khuẩn không gây bệnh thường có kích thước lớn hơn. Một số loại trục khuẩn gây bệnh thường gặp như các vi khuẩn: lao, thương hàn, lỵ, *E. coli*.....



Hình 1.3. Hình thể một số trực khuẩn

- Xoắn khuẩn (Spirochaetales)

Xoắn khuẩn là những vi khuẩn có hình sợi xoắn lò so và di động. Chiều dài của các vi khuẩn loại này có thể tới 30 μm Trong loại này có 3 giống vi khuẩn gây bệnh quan trọng là Treponema (ví dụ, xoắn khuẩn giang mai - Treponema pallidum), Leptospira và Borrelia.



Hình 1.4 Hình thể một số xoắn khuẩn

Ngoài những vi khuẩn có hình dạng điển hình trên còn có những loại vi khuẩn có hình thể trung gian:

- Trung gian giữa cầu khuẩn và trực khuẩn là cầu trực khuẩn, như vi khuẩn dịch hạch
- Trung gian giữa trực khuẩn và xoắn khuẩn là phẩy khuẩn mà điển hình là phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*).

Cách sắp xếp của các loại vi khuẩn cũng khác nhau: đứng từng con, từng chuỗi, từng chùm hoặc hình chữ V, N... là do trực phân bào khác nhau của chúng.

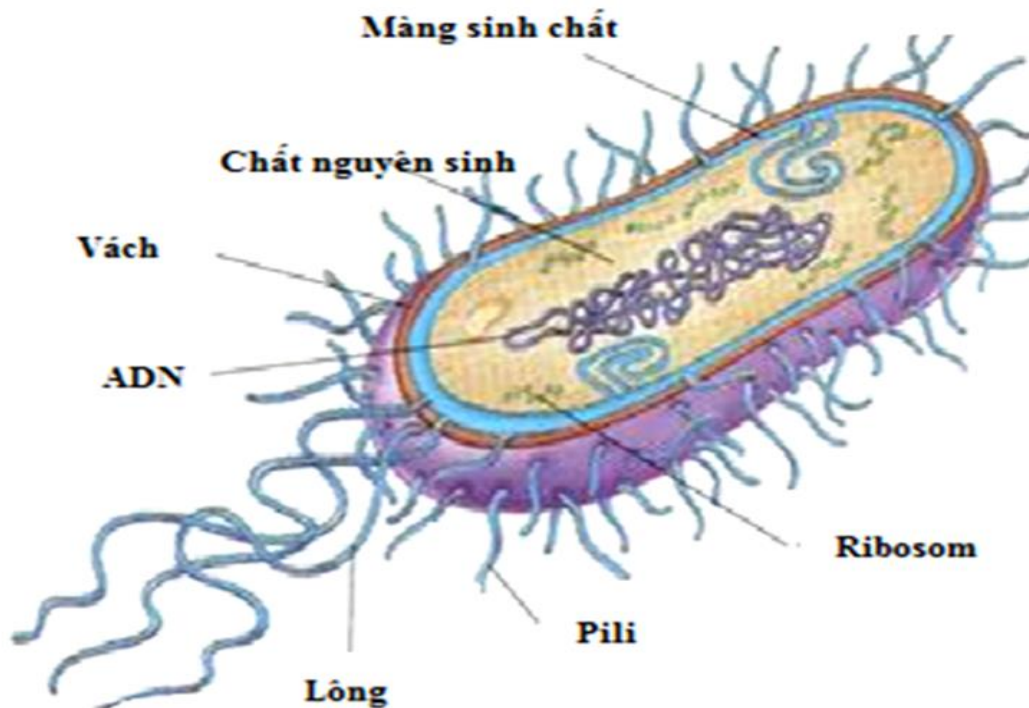
1.3. Cấu trúc của vi khuẩn

1.3.1. Thành phần cấu trúc chung:

- Nhân

Vi khuẩn không có nhân điển hình, vì không có màng nhân, nên vi khuẩn là procaryote. Cơ quan chứa thông tin di truyền của chúng là một nhiễm sắc thể (chromosome) độc nhất tồn tại trong chất nguyên sinh. Nó là 1 phân tử ADN dài

khoảng 1 mm (gấp 1000 lần chiều dài của tế bào vi khuẩn đường tiêu hóa), khép kín. Phân tử ADN này có trọng lượng 2 tỷ dalton, chứa khoảng 3000 gen, được bao bọc bởi protein kiềm. Lớp protein này không tồn tại khi vách tế bào vi khuẩn bị phá hủy. Nó được sao chép theo nguyên tắc bán bảo tồn (Watson và Crick) và diễn ra trước khi phân bào. Một số vi khuẩn còn có những yếu tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể đó là các loại plasmid. ngoài ra, còn phải kể đến một thành phần di truyền nữa là transposon.



Hình 1.5. Cấu trúc vi khuẩn

- Chất nguyên sinh (cytoplasma)
- + Chất nguyên sinh của vi khuẩn chứa đựng tới 80% nước, dưới dạng gel, bao gồm các thành phần hòa tan như protein, peptit, acid amin, vitamin, ARN, ribosom, các muối khoáng (Ca, Na, P...) và cả một số nguyên tố hiếm.
- Protein chiếm tới 50% trọng lượng khô của vi khuẩn và khoảng 90% năng lượng của vi khuẩn để tổng hợp protein. Các enzym nội bào được tổng hợp đặc hiệu với từng loại vi khuẩn.
- + Ribosom có nhiều trong chất nguyên sinh. Mỗi Ribosom của vi khuẩn bao gồm 2 tiểu phần (50S và 30S). Mỗi tiểu phần chứa 2 thành phần đại phân tử: protein và ARN - được gọi là protein và ARN ribosom. Khi tổng hợp protein, các ribosom gắn với ARN thông tin và được gọi là polysom. Ribosom của vi khuẩn có hằng số lắng

70S. Ribosom cũng là nơi tác động của một số loại kháng sinh, làm sai lệch sự tổng hợp protein của vi khuẩn, như aminozid, chloramphenicol...

Ngoài các thành phần hòa tan, chất nguyên sinh còn chứa các hạt vùi. Đây là những không bào chứa lipid, glycogen; một số không bào chứa các chất có tính đặc trưng cao với một số loại vi khuẩn.

Nếu so sánh với tế bào của vi sinh vật có nhân điển hình (eucaryote) trong chất nguyên sinh của vi khuẩn không có: ty thể, lục thể, lưới nội bào và cơ quan phân bào.

- Màng nguyên sinh (cytoplasmic membrane)

+ Vị trí: màng nguyên sinh bao quanh chất nguyên sinh và nằm trong vách tế bào vi khuẩn.

+ Cấu trúc: là một lớp màng mỏng, tinh vi và chun giãn. Màng nguyên sinh chất của vi khuẩn bao gồm 60% protein, 40% lipid mà đa phần là photpholipit.

Chúng gồm hai lớp tối (2 lớp photpho) bị tách biệt giữa 1 lớp sáng (lớp lipid), sự giống nhau này dẫn tới khái niệm đơn vị màng. Tất cả các màng nguyên sinh giống nhau về cấu trúc phân tử. Nhiều thuộc tính của màng này phụ thuộc vào sự tồn tại và cấu trúc của photpholipid. Các phân tử photpholipid có cực ở một đầu (đầu chứa photpho) và không cực ở đầu còn lại. Đầu có mạng điện tích ở phía mặt ngoài và trong của màng, còn đầu không mang điện tích nằm giữa. Dung dịch nước tồn tại ở cả 2 mặt của màng sinh chất. Trong thực tế, các màng này có nhiều vai trò sinh lý khác nhau.

• Chức năng của màng nguyên sinh:

Màng nguyên sinh thực hiện một số chức năng quyết định sự tồn tại của tế bào vi khuẩn:

• Màng nguyên sinh chất là cơ quan hấp thụ và đào thải chọn lọc các chất, nhờ 2 cơ chế khuếch tán thẩm thấu bị động và vận chuyển chủ động. Với cơ chế bị động, các chất được hấp thụ và đào thải nhờ áp lực thẩm thấu. Chỉ những chất có phân tử lượng bé hơn vài trăm dalton và có thể hòa tan trong nước mới có thể vận chuyển qua màng. Nhưng thường áp lực thẩm thấu trong tế bào vi khuẩn lớn hơn bên ngoài nhiều lần (có những chất lớn hơn khoảng 1000 lần). Do vậy, cách khuếch tán bị động không thể thực hiện được mà phải nhờ tới cách vận chuyển chủ động. Hình thức vận chuyển này cần tới enzym và năng lượng. Đó là các permease đặc hiệu với từng chất hoặc nhóm chất và ATP.

• Màng nguyên sinh chất là nơi tổng hợp các enzym ngoài bào.

• Màng sinh chất cũng là nơi tổng hợp các thành phần của vách tế bào.

• Màng sinh chất cũng là nơi tồn tại của hệ thống enzym hô hấp tế bào, nơi thực hiện

các quá trình năng lượng chủ yếu của tế bào thay cho chức năng của ty lạp thể.

- Màng sinh chất tham gia vào quá trình phân bào nhờ các mạc thể (mesosome). Mạc thể là phần lõm và cuộn vào chất nguyên sinh của màng sinh chất, thường gặp ở vi khuẩn Gram (+). Khi tế bào phân chia, mạc thể tiến sâu vào chất nguyên sinh.

- Vách (cell wall)

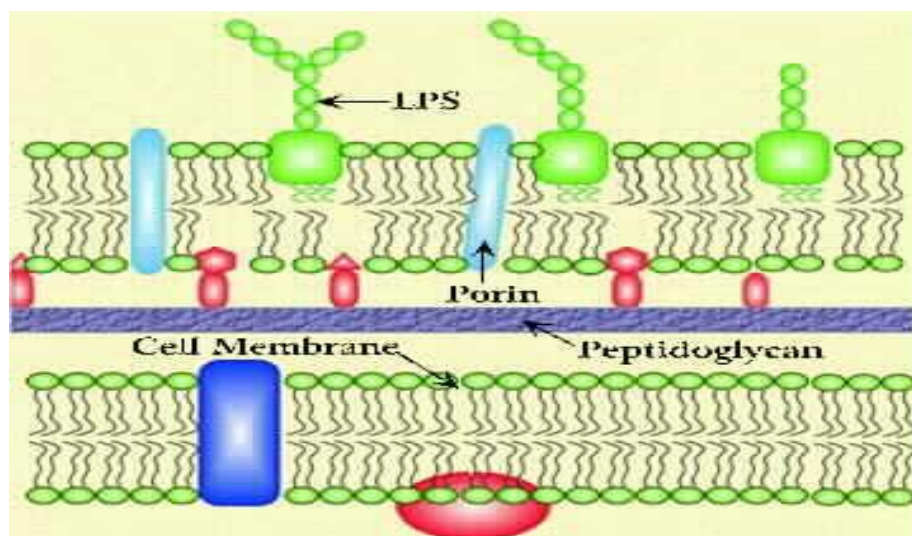
Có ở mọi vi khuẩn trừ Mycoplasma. Vách vi khuẩn được quan tâm vì cấu trúc đặc biệt và chức năng của nó.

+ Cấu trúc: Vách tế bào là bộ khung vững chắc bao bên ngoài màng sinh chất. Vách được cấu tạo bởi đại phân tử glycopeptit (peptidoglycan), nối với nhau tạo thành mạng lưới phức tạp bao bên ngoài màng nguyên sinh. Nó được tổng hợp liên tục. Thành phần cấu tạo bao gồm: đường amin (amino sugar) và acid amin. Đường-amin gồm 2 loại acid N - axetyl muramic và N - axetyl glucozamin. Hai loại này trùng hợp xen kẽ nhau tạo thành những sợi dài của mỗi lớp. Acid amin cũng chỉ bao gồm một số loại như: D-alanin, D-glutamic, L-ananin và L-lysin. Các acid amin này thay đổi theo loại vi khuẩn. Các acid amin tạo thành các tetrapeptid làm cầu nối giữa các sợi cùng và khác lớp.

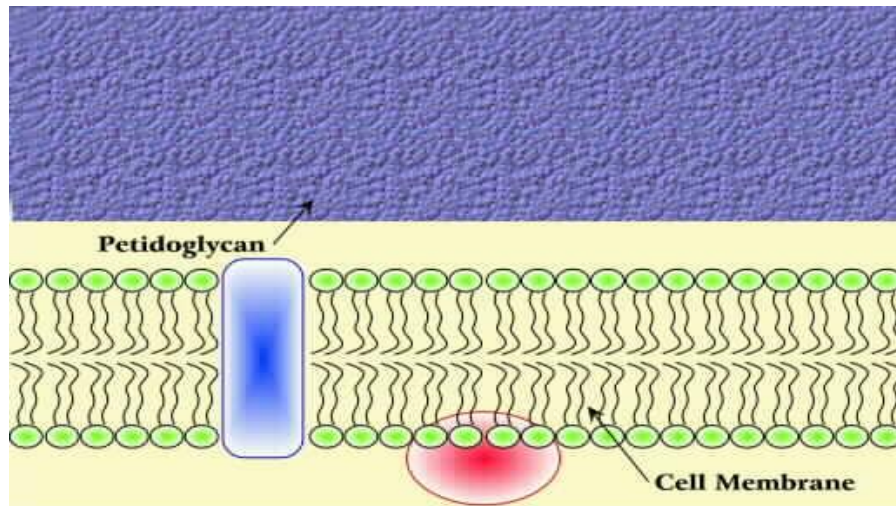
Vách tế bào của các vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) có những khác nhau:

- Vách vi khuẩn Gram(+): bao gồm nhiều lớp peptidoglycan.

Ngoài lớp peptidoglycan, ở đa số vi khuẩn Gram (+) còn có acid teichoic là thành phần phụ thêm. Tùy loại vi khuẩn mà bao bên ngoài lớp peptidoglycan có thể là polysaccarit hoặc polypeptid. Các lớp ngoài cùng thường đóng vai trò kháng nguyên thân đặc hiệu.



Hình 1.6. Cấu trúc vách vi khuẩn Gram (-)



Hình 1.7. Cấu trúc vách vi khuẩn Gram (+)

- Vách của các vi khuẩn Gram (-):

Vách của các vi khuẩn Gram (-) chỉ bao gồm một lớp peptidoglycan, nên vách này mỏng hơn vách vi khuẩn Gram (+). Do vậy chúng dễ bị phá vỡ bởi các lực cơ học hơn.

Bên ngoài lớp peptidoglycan, vách vi khuẩn Gram (-) còn có các lớp: protein, lipit A và polysaccarit. Người ta rất quan tâm đến các lớp này, vì chúng chính là nội độc tố của các vi khuẩn gây bệnh. Đồng thời nó cũng là kháng nguyên thân của các vi khuẩn Gram (-). Trong đó lớp polysaccarit ngoài cùng quyết định tính đặc hiệu kháng nguyên, còn lớp protein quyết định tính miễn dịch. Lớp lipid đóng vai trò chủ yếu của độc tính nội độc tố.

+ Chức năng của vách:

- Chức năng quan trọng nhất của vách là duy trì hình dạng vi khuẩn, áp lực thẩm thấu bên trong vi khuẩn thường cao hơn môi trường mà vi khuẩn tồn tại khá nhiều. Chính vách tế bào vi khuẩn đã giữ để màng sinh chất không bị căng phồng ra, rồi tan vỡ.

Trong tự nhiên cũng như trong phòng thí nghiệm, ta có thể gặp những vi khuẩn không có vách tế bào. Chúng được gọi là "L-form" (dạng L). Tên này được viện Vi sinh vật Lister Luân đôn đặt sau khi họ phát hiện ra dạng vi khuẩn này.

Các vi khuẩn "L-form" có thể mất hoàn toàn hay không mất khả năng tổng hợp peptidoglycan. Các vi khuẩn "L-form" Gram (-), nếu như không thể tổng hợp được peptidoglycan nhưng vẫn có thể tổng hợp được các lớp bên ngoài của vách tế bào. Tất cả vi khuẩn "L-form" đều có khả năng đề kháng với nhóm kháng sinh tác động trên vách (nhóm beta lactam).

Một loài vi khuẩn khác không có vách tế bào, đó là Mycoplasma. Loại vi khuẩn này thường phát triển chậm và cần có huyết thanh (khoảng 20%). Một số Mycoplasma

cần có sterol trong môi trường, hình như sterol trong môi trường đã gắn vào màng sinh chất của Mycoplasma và làm cho lớp màng này thêm vững chắc.

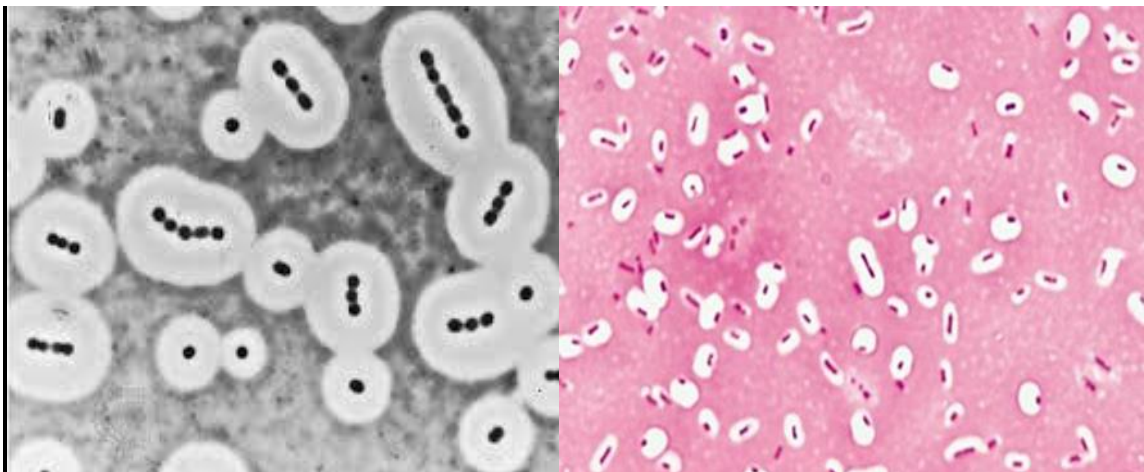
Ngoài chức năng duy trì hình dạng của vi khuẩn, vách tế bào còn có một số ý nghĩa khác:

- Vách tế bào quy định tính chất nhuộm Gram.
- Vách vi khuẩn Gram(-) chứa đựng nội độc tố, quyết định độc lực và khả năng gây bệnh của các vi khuẩn gây bệnh bằng nội độc tố.
- Vách vi khuẩn quyết định tính chất kháng nguyên thân của vi khuẩn. Đây là loại kháng nguyên quan trọng nhất để xác định và phân loại vi khuẩn.
- Vách tế bào vi khuẩn là nơi tác động của nhóm kháng sinh khá quan trọng (nhóm beta lactam), đồng thời là nơi tác động của lyzozim.
- Vách tế bào vi khuẩn cũng là nơi mang các điểm tiếp nhận (receptor) đặc hiệu cho thực khuẩn thể (bacteriophage). Vấn đề này có ý nghĩa trong việc phân loại vi khuẩn, cũng như phage và các nghiên cứu cơ bản khác.

1.3.2. Thành phần cấu trúc riêng: chỉ có ở một số vi khuẩn, có thể có 1 hoặc nhiều thành phần riêng, gồm 4 thành phần

- Vỏ (capsule)

Vỏ của vi khuẩn hay là một lớp nhày lỏng lẻo, sền sệt, không rõ rệt bao quanh vi khuẩn. Người ta quan sát nó bằng phương pháp nhuộm mực tàu. Vỏ là vùng sáng chống lại nền tối, khuẩn lạc của những vi khuẩn có vỏ thường nhày, ướt và sáng. Chỉ một số vi khuẩn và trong những điều kiện nhất định vỏ mới hình thành.



Hình 1.8. Vỏ của vi khuẩn

Bản chất hóa học của vỏ: Vỏ của các vi khuẩn khác nhau có thành phần hóa học không giống nhau. Vỏ của nhiều vi khuẩn là polysaccharit, như vỏ của *E. coli*, *Klebsiella*, phế cầu... Nhưng vỏ của một số vi khuẩn khác là polypeptit như vi khuẩn

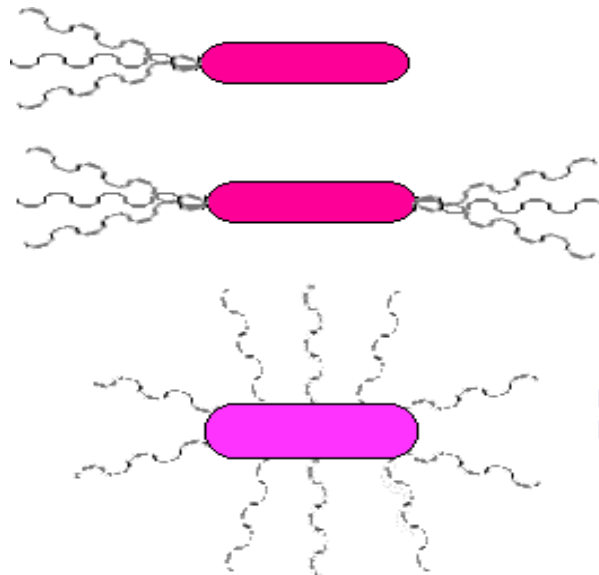
dịch hạch, trực khuẩn than, do một vài acid amin tạo nên. Những acid amin này thường là dạng D, dạng ít gặp trong tự nhiên.

Chức năng: Vỏ vi khuẩn đóng vai trò bảo vệ cho một loại vi khuẩn dưới những điều kiện nhất định. Chúng có tác dụng chống thực bào. Vỏ cũng tạo nên kháng nguyên vỏ cũng có thể dùng để phân loại.

- Lông (flagella)

+ Cấu trúc và vị trí: Lông là những sợi protein dài và xoắn tạo thành từ các acid amin dạng D. Nó là cơ quan vận động và không phải có ở mọi loại vi khuẩn.

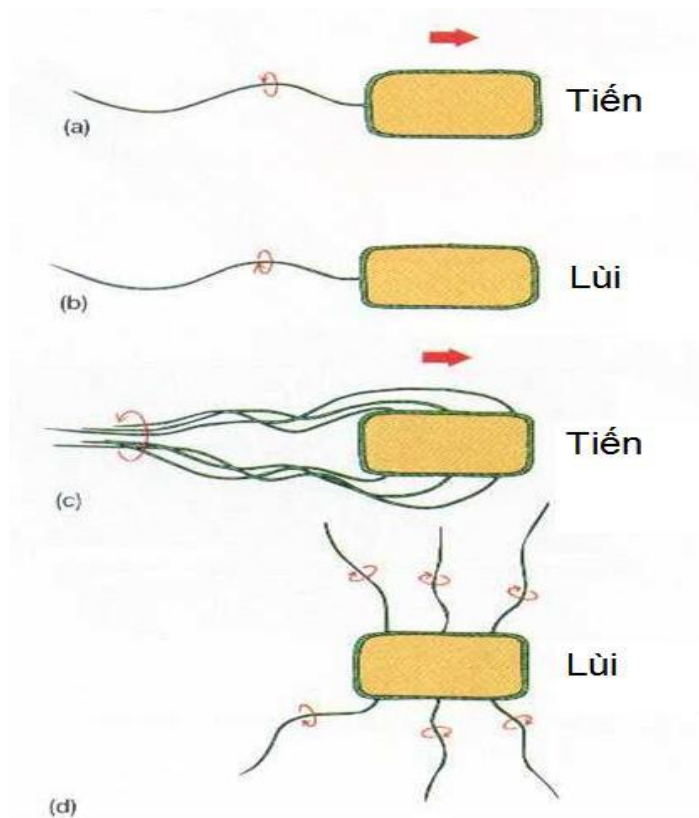
+ Vị trí lông của các vi khuẩn có những khác nhau: một số chỉ có lông ở một đầu (phẩy khuẩn tả), nhiều vi khuẩn lại có lông quanh thân (*Salmonella*, *E. coli*), một vài vi khuẩn lại có một chùm lông ở đầu.



Hình 1.9. Các vị trí của lông

(a) Lông quanh thân, (b) Chùm lông ở một đầu, (c) 1 lông ở một đầu

+ Cơ chế của sự chuyển động: Lông là cơ quan di động. Làm mất lông vi khuẩn không di động. Nuôi trong môi trường thích hợp, lông hình thành và vi khuẩn lại di động. Lông quay quanh trục dài của nó giúp cho vi khuẩn di động.



Hình 1.10. Chức năng của lông

**(a) và (b) sự di động của vi khuẩn có 1 lông,
(c) và (d) sự di động của vi khuẩn có nhiều lông**

Vi khuẩn vận động đến nơi có lợi và đi xa nơi bất lợi cho nó. Nhưng do cơ chế nào thì hiện nay người ta chưa rõ. Có thể các phân tử tiếp nhận (receptor) trên màng sinh chất đã đóng vai trò này. Lông tạo nên kháng nguyên lông "H".

- Pili

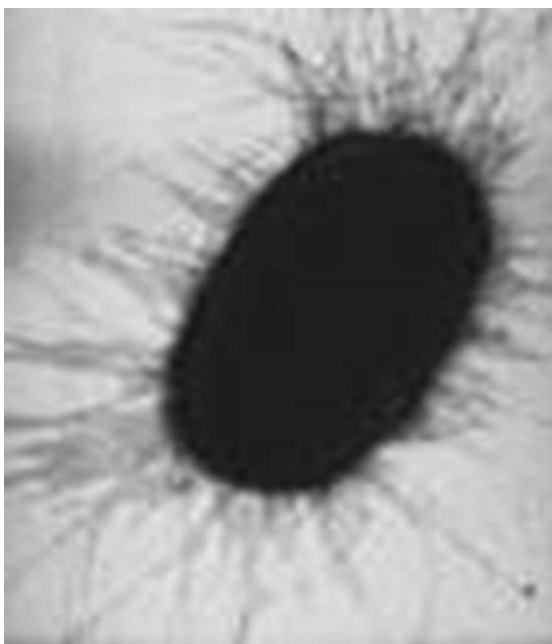
Pili cũng là cơ quan phụ của vi khuẩn như lông. Nó có thể mất đi mà không ảnh hưởng tới sự tồn tại của vi khuẩn. Pili có ở nhiều vi khuẩn Gram âm nhưng đến nay người ta mới biết có ở một loại vi khuẩn Gram dương.

Cấu trúc: Pili có cấu trúc như lông nhưng ngắn và mỏng hơn.

Chức năng: Dựa vào chức năng, người ta chia pili làm 2 loại:

+ Pili giới tính hay pili F (fertility) chỉ có ở các vi khuẩn đực, dùng để vận chuyển chất liệu di truyền sang vi khuẩn cái. Mỗi vi khuẩn đực chỉ có một pili này.

+ Pili khác: là những pili dùng để bám. Vì thế người ta còn gọi pili là cơ quan để bám của vi khuẩn. Mỗi tế bào vi khuẩn có thể có tới hàng trăm pili này. Nhờ pili này vi khuẩn có thể bám lên bề mặt môi trường lỏng hoặc tế bào. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn lậu cũng liên quan với sự có mặt của pili. Các vi khuẩn có pili dễ dàng bám vào các tế bào có màng nhân (eucaryote).



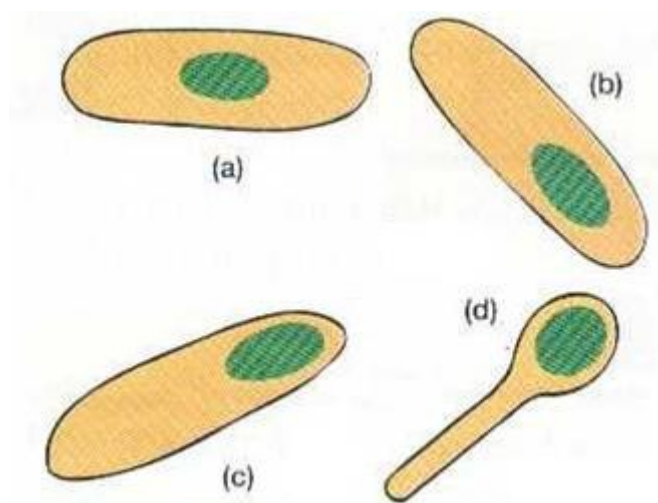
Hình 1.11 . Lông và pili của vi khuẩn

- Nha bào

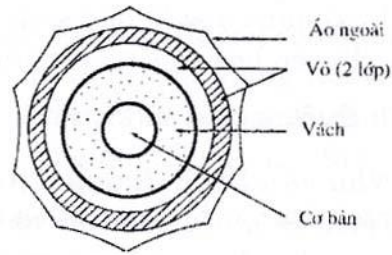
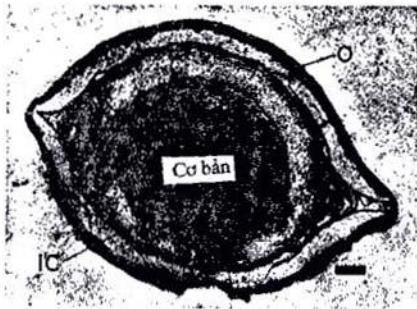
Nhiều loại vi khuẩn có khả năng tạo nha bào khi điều kiện sống không thuận lợi. Mỗi vi khuẩn chỉ tạo được một nha bào. Khi điều kiện sống thuận lợi nha bào vi khuẩn lại nảy mầm để đưa vi khuẩn trở lại dạng sinh sản.

Cấu trúc nha bào:

- + ADN nằm trong thể nguyên sinh.
- + Màng nha bào bao bên ngoài thể nguyên sinh.
- + 2 lớp vách (trong và ngoài) bao bên ngoài màng nha bào.
- + Lớp áo ngoài bao hai lớp vách.



Hình 1.12. Một số ví trí của nha bào
(a) Giữa thân, (b) và (c) Gần đầu, (d) ở một đầu



Thiết đồ nha bào *Bacillus megatherium* C: vách; IC: vỏ trong; O: vỏ ngoài.

Sơ đồ cấu trúc nội nha bào (endospore)

Hình 1.13. Cấu trúc của nha bào

Sự đề kháng với các yếu tố lý hóa của nha bào là do một số thay đổi về thành phần hóa học của nha bào quy định:

Acid dipicolinic chiếm 20% nha bào, Ion Ca^{2+} , cystein, tỷ lệ nước thấp (10-20%), sự tổng hợp ADN dừng lại và sự phiên mã cũng bị ức chế.

Sự tồn tại lâu (có thể 150000 năm) liên quan đến sự mất nước và không thấm nước nên không chuyển hóa của nha bào.

1.4. Sinh lý của vi khuẩn

Vi khuẩn cũng là một sinh vật, nên chúng cũng có khả năng dinh dưỡng, hô hấp, chuyển hóa và sinh sản như các sinh vật khác.

1.4.1. Dinh dưỡng của vi khuẩn

- Nhu cầu dinh dưỡng

Trong quá trình sinh sản và phát triển, vi khuẩn đòi hỏi phải có nhiều thức ăn với tỷ lệ tương đối cao so với trọng lượng của cơ thể. Người chỉ cần một lượng thức ăn bằng 1% trọng lượng của cơ thể/ngày, còn vi khuẩn cần một lượng thức ăn bằng trọng lượng cơ thể nó, vì vi khuẩn sinh sản phát triển rất nhanh, chúng cần những thức ăn để tạo ra năng lượng và những thức ăn để tổng hợp. Những thức ăn này bao gồm các nitơ hóa hợp (acid amin hoặc muối amoni), cacbon hóa hợp thường là các oxa, nước và các muối khoáng ở dạng ion như PO_4H^{2-} , Cl^- , HSO_4^- , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ và một số ion kim loại hiếm ở nồng độ rất thấp (Mn^{2+} , Fe^{2+} , $Co...$)

Rất nhiều vi khuẩn phân lập trong tự nhiên có thể tổng hợp được mọi enzym từ một hợp chất cacbon độc nhất để hình thành những chất chuyển hóa cần thiết tham gia trong quá trình chuyển hóa.

- **Cơ chế dinh dưỡng của vi khuẩn:** Nhờ sự hấp thu và đào thải các chất qua màng.

1.4.2. Hô hấp của vi khuẩn

Hô hấp là quá trình trao đổi chất, tạo ra năng lượng cần thiết để tổng hợp nên các chất mới của tế bào.

Các loại hô hấp của vi khuẩn

- Hô hấp hiếu khí hay là oxy hóa: Nhiều loại vi khuẩn dùng oxy của khí trời để oxy hóa lại coenzym khử.

- Hô hấp kỵ khí: Một số vi khuẩn không thể sử dụng oxy tự do làm chất nhận điện tử cuối cùng. Chúng không thể phát triển được hoặc phát triển rất kém khi môi trường có oxy tự do vì oxy độc đối với chúng.

Những vi khuẩn này được gọi là vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối, chúng không có cytochrom oxydase và không có toàn bộ hay một phần của chuỗi cytochrom.

- Hô hấp hiếu khí tùy ngộ: Một số vi khuẩn hiếu khí có thể hô hấp theo kiểu lên enzym ta gọi chúng là hiếu kỵ khí tùy ngộ.

1.4.3. Chuyển hóa của vi khuẩn

Vi khuẩn rất nhỏ bé nhưng sinh sản phát triển rất nhanh chóng, do chúng có hệ thống enzym phức tạp.

Mỗi loại vi khuẩn có một hệ thống enzym riêng, nhờ có hệ thống enzym này mà vi khuẩn có thể dinh dưỡng, hô hấp và chuyển hóa để sinh sản và phát triển.

+ Chuyển hóa đường.

Đường là một chất vừa cung cấp năng lượng vừa cung cấp nguyên liệu để cấu tạo. Chuyển hóa đường tuân theo một quá trình phức tạp, từ polyozit đến ozit qua glucose rồi đến pyruvat: lactose → glucose → esteglucose-6-phosphoric → pyruvat. Pyruvat đóng vai trò trung tâm trong quá trình chuyển hóa các chất đường.

+ Chuyển hóa các chất đạm.

Các chất đạm cũng được chuyển hóa theo một quá trình phức tạp từ albumin đến acid amin:

Albumin → protein → pepton → polypeptit → acid amin.

+ Các chất được hợp thành

Ngoài những sản phẩm chuyển hóa trong quá trình đồng hóa trên và ngoài các chất là thành phần của bản thân vi khuẩn, còn có một số chất được hình thành:

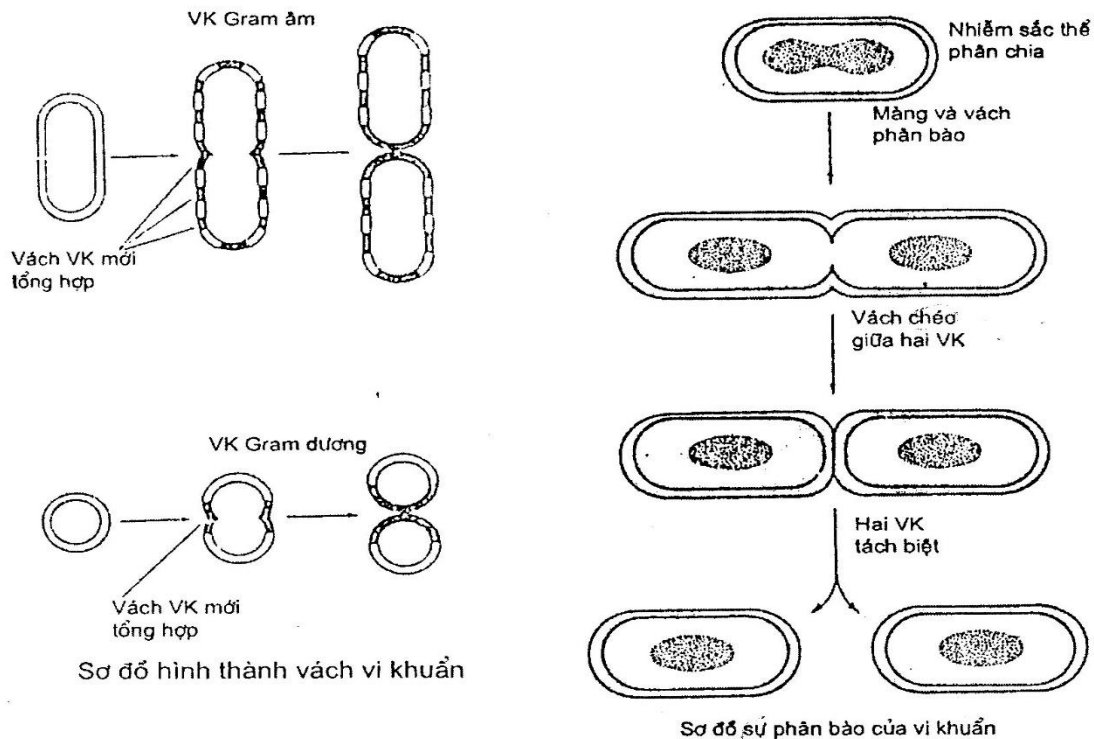
- Độc tố: Phần lớn các vi khuẩn gây bệnh trong quá trình sinh sản và phát triển đã tổng hợp nên độc tố.

- Kháng sinh: Một số vi khuẩn tổng hợp được chất kháng sinh, chất này có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt các vi khuẩn khác loại.

- Chất gây sốt: Một số vi khuẩn có khả năng sản sinh ra một chất tan vào nước, khi tiêm cho người hay súc vật gây nên phản ứng sốt.

- Sắc tố: Một số vi khuẩn có khả năng sinh ra các sắc tố như màu vàng của tụ cầu, màu xanh của trực khuẩn mũ xanh...
- Vitamin: Một số vi khuẩn đặc biệt (đặc biệt là *E. coli*) của người và súc vật có khả năng tổng hợp được vitamin (C, K...)

1.4.5. Sinh sản



Hình 1.15. Sự sinh sản của vi khuẩn

Vi khuẩn sinh sản theo kiểu song phân, từ một tế bào mẹ tách thành hai tế bào con. sự phân chia bắt đầu bằng nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Sau đó màng sinh chất và vách tiến sâu vào phân chia tế bào làm hai phần. Thời gian phân bào của các vi khuẩn thường là 20 phút đến 30 phút, riêng vi khuẩn lao khoảng 25 giờ là một thế hệ.

1.5. Di truyền vi khuẩn

1.5.1. Do đột biến (những biến đổi kiểu gen)

- Định nghĩa: Đột biến (mutation) là sự thay đổi đột ngột một tính chất của cá thể trong quần thể đồng nhất. Đột biến di truyền được, do đó có một clon mới được hình thành từ cá thể đặc biệt này và điều đó nghĩa là sẽ xuất hiện một biến chủng (mutant) từ chủng hoang dại (wildtype) ban đầu.

Một số đột biến có ý nghĩa quan trọng đối với vi sinh y học là những đột biến kháng kháng sinh, kháng phage; đột biến thay đổi cấu trúc kháng nguyên; mất tính di động hoặc sản xuất dư thừa sản phẩm chuyên hoá.

- Các tính chất của đột biến:

Hiếm: Tất cả các đột biến đều hiếm thấy và xảy ra không đều. Số biến chủng trong một quần thể gọi là tần số biến chủng (mutants frequency). Tần số biến chủng cho mỗi đặc tính ở mỗi cá thể là khác nhau, có thể từ 10^{-5} - 10^{-11} . Xác suất xuất hiện một đột biến trên một tế bào trong một thế hệ gọi là suất đột biến (mutation rate). Suất đột biến ngẫu nhiên cho một gen nhất định khoảng 10^{-5} và cho một cặp nucleotid nhất định khoảng 10^{-8} .

Vững bền: Đặc tính đột biến di truyền cho thế hệ sau, mặc dù chất chọn lọc không còn nữa. Biến đảo là đột biến của biến chủng, kết quả biến chủng mới sẽ gần giống hoặc giống hệt chủng hoang dại ban đầu.

Ngẫu nhiên:

Đột biến có sẵn trước khi có nhân tố chọn lọc tác động. Điển hình là kiểu đột biến một bước (one-step mutation - hoặc kiểu streptomycin), ở đây mức độ đề kháng không phụ thuộc vào nồng độ kháng sinh được tiếp xúc, ví dụ đột biến kháng streptomycin, rifampicin, acid nalidixic, erythromycin.

Đột biến nhiều bước (multi-step mutation - hoặc kiểu penicillin) xảy ra chậm và từng bước một; ở đây mức độ đề kháng có phụ thuộc vào nồng độ kháng sinh được tiếp xúc, ví dụ đột biến kháng penicillin, cephalosporin, tetracyclin, chloramphenicol.

Nếu lượng kháng sinh thấp, không đủ để tiêu diệt được vi khuẩn thì có thể chính nó lại là yếu tố kích thích đột biến, tạo ra đột biến cảm ứng và lúc này suất đột biến sẽ cao hơn đột biến ngẫu nhiên; hoặc chính nó trở thành yếu tố chọn lọc ra những dòng vi khuẩn đề kháng cho những đột biến tiếp theo với mức độ đề kháng cao hơn. Vì vậy, ứng dụng hiểu biết này trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn: Kháng sinh phải được dùng đủ liều lượng.

Độc lập và đặc hiệu: Nói chung đột biến một tính chất này không ảnh hưởng đến đột biến tính chất khác. Xác suất một đột biến kép (đột biến hai tính chất) bằng tích số xác suất hai đột biến đơn tương ứng. Ví dụ: Hai tính chất A và B; suất đột biến A \rightarrow a là 10^{-5} và B \rightarrow b là 10^{-7} , thì suất đột biến AB \rightarrow ab là 10^{-12} . Một ứng dụng điển hình là việc phối hợp kháng sinh trong điều trị bệnh lao.

1.5.2. Do tái tổ hợp kinh điển chất liệu di truyền trên nhiễm sắc thể

- Biến nạp (Transformation)

+ Định nghĩa: Là sự vận chuyển một đoạn ADN của vi khuẩn cho nạp vào vi khuẩn nhận (xem hình...).

+ Điều kiện:

Vi khuẩn cho phải bị phá vỡ (ly giải).

Nhiễm sắc thể của nó được giải phóng và bị cắt thành những đoạn ADN nhỏ.

Vi khuẩn nhận phải ở trạng thái sinh lý đặc biệt (competent, khả biến) cho phép những mảnh ADN xâm nhập vào tế bào.

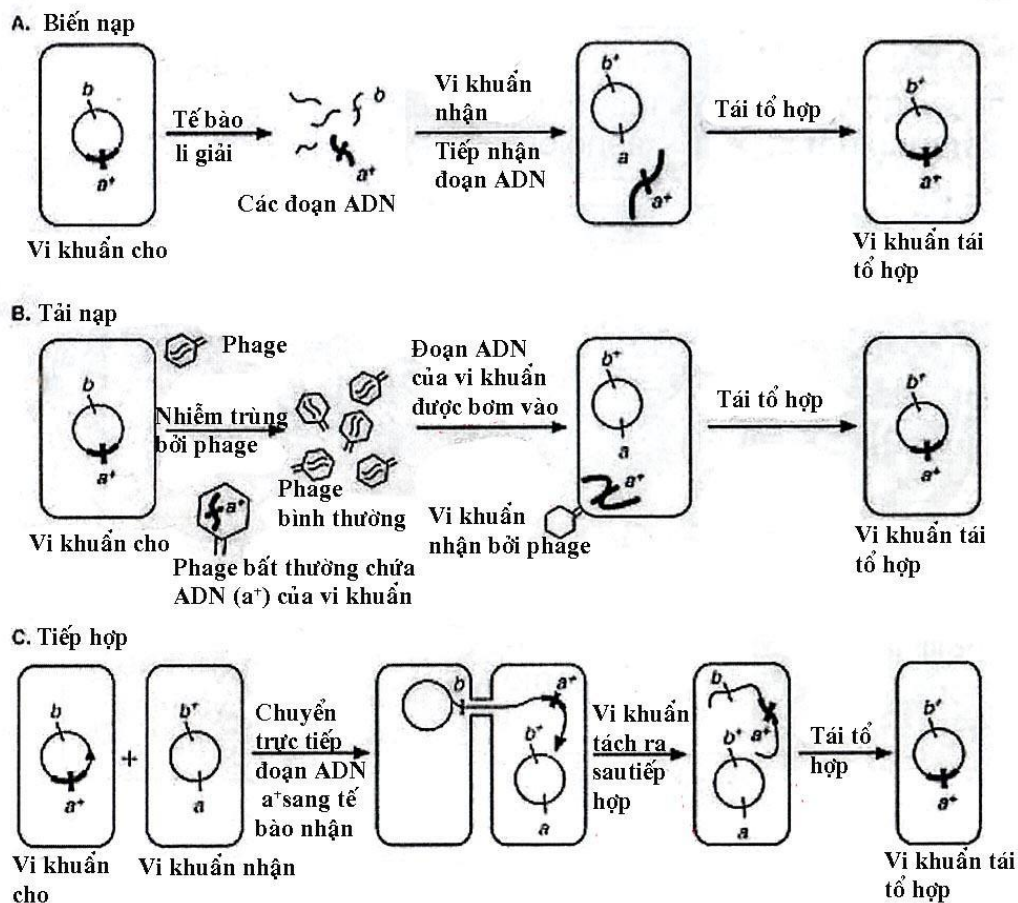
+ Hai giai đoạn xảy ra trong quá trình biến nạp:

Nhận mảnh ADN và

Tích hợp mảnh ADN đã nhận vào nhiễm sắc thể qua tái tổ hợp kinh điển.

Ví dụ: Biến nạp đặc tính hình thành vỏ của *Streptococcus pneumoniae* (thực nghiệm in vivo của Griffith năm 1928 và in vitro của Avery, Macleod và McCarty năm 1944). Hiện tượng biến nạp còn được quan sát thấy ở *Haemophilus*, nấm mô cầu, liên cầu...

Kỹ thuật biến nạp được áp dụng trong công nghệ sinh học là biến nạp gen tổng hợp insulin vào tế bào *E. coli* hoặc nấm enzyme để sản xuất insulin.



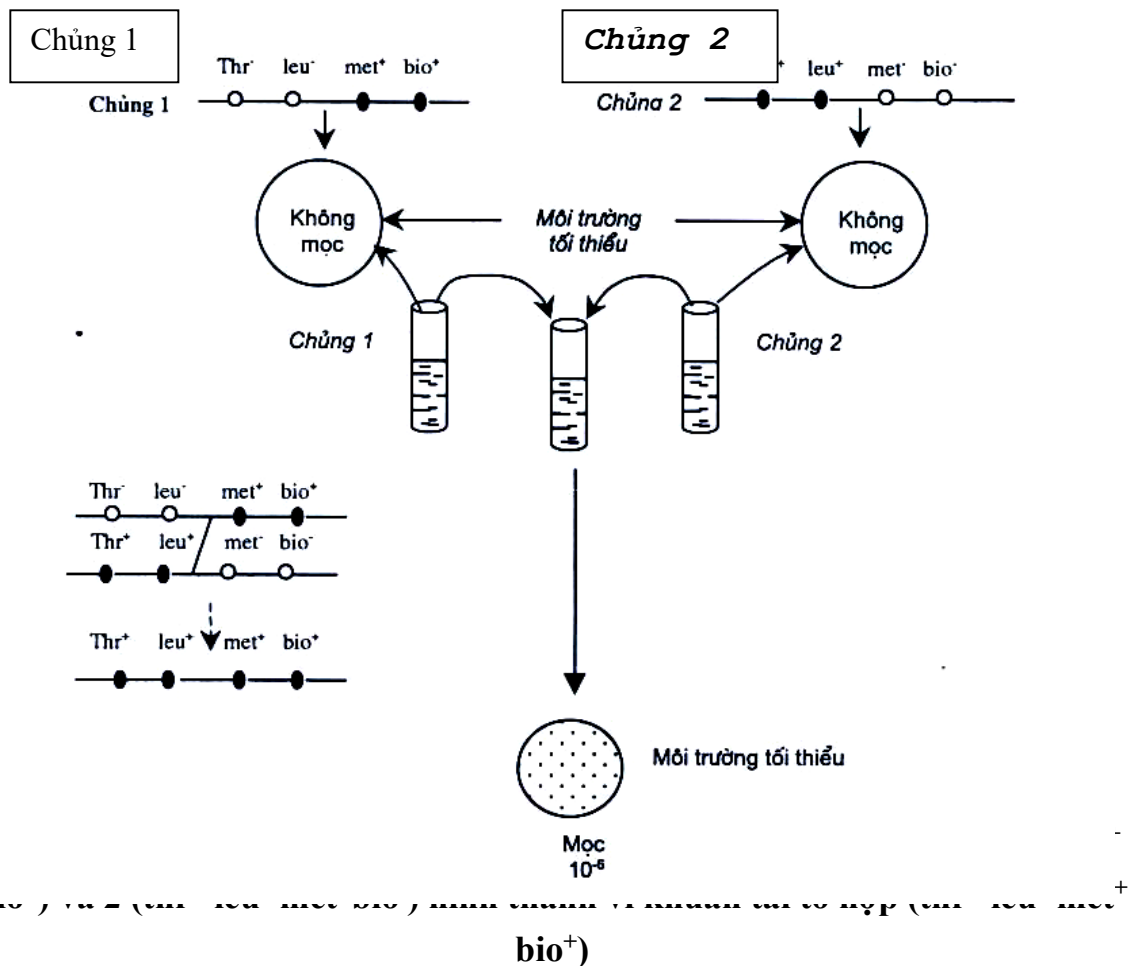
Hình 1.16. Ba hình thức vận chuyển chất liệu di truyền

- Tiếp hợp (Conjugation)

Định nghĩa: Là sự vận chuyển chất liệu di truyền từ vi khuẩn đực sang vi khuẩn cái khi hai vi khuẩn tiếp xúc với nhau (xem hình...).

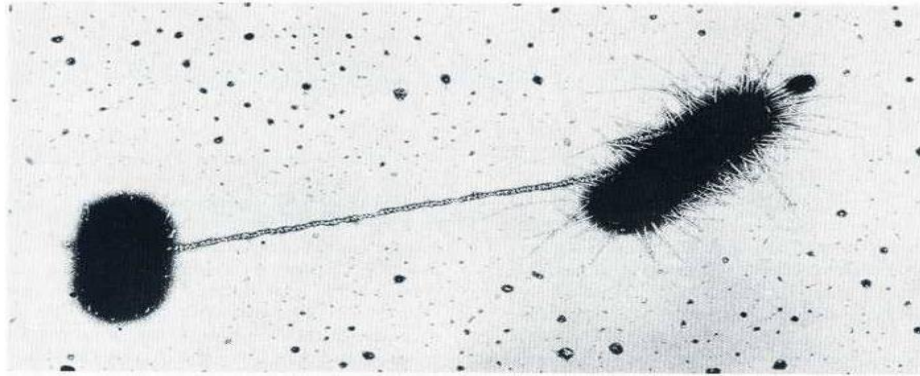
Ba giai đoạn xảy ra trong quá trình tiếp hợp:

- Tiếp hợp hai tế bào qua cầu giao phối (pili giới tính).
- Chuyển gen.
- Tích hợp đoạn gen chuyển vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhận qua tái tổ hợp kinh điển.



Chú thích: Chủng 1 là biến chủng không tự tổng hợp được $thr^- leu^-$; chủng 2 là biến chủng không tự tổng hợp được $met^- bio^-$. Vi khuẩn tái tổ hợp tự tổng hợp được toàn bộ acid amin nên mọc được trên môi trường tối thiểu (không có chất hữu cơ, chỉ

có NH_4Cl là nguồn cung cấp nitơ).



Hình 1.18. Tiếp hợp giữa vi khuẩn F^+ và vi khuẩn F^-

Điều kiện xảy ra tiếp hợp: Một vi khuẩn phải có yếu tố giới tính F (Fertility factor), tức là có pili giới tính làm cầu giao phối; những vi khuẩn có yếu tố F gọi là vi khuẩn đực F^+ , vi khuẩn không có yếu tố F gọi là vi khuẩn cái F^- . Yếu tố F có thể tồn tại ở 3 trạng thái: F^+ , Hfr hoặc F' .

- F^+ : Yếu tố F nằm trong nguyên tương
- Hfr: Yếu tố F tích hợp vào nhiễm sắc thể
- F' : Sau khi yếu tố F tích hợp vào nhiễm sắc thể, lại rời ra, nằm tự do trong nguyên tương nhưng có mang theo một đoạn ADN của nhiễm sắc thể

Tiếp hợp thường xảy ra giữa những vi khuẩn cùng loại nhưng cũng có thể xảy ra giữa những vi khuẩn khác loại như *E. coli* với *Salmonella* hoặc *Shigella* nhưng tần số tái tổ hợp thấp.

- Tải nạp (Transduction)

Định nghĩa: Là sự vận chuyển chất liệu di truyền từ vi khuẩn cho nạp vào vi khuẩn nhận nhờ phage.

Thí nghiệm của Zinder và Lederberg 1952: Hai biến chủng *Salmonella* try^+his^- và *Salmonella* try^-his^+ được tạo ra để phục vụ thí nghiệm này; vì không tự tổng hợp được acid amin hoặc *try* hoặc *his*, hai biến chủng này không mọc được trên môi trường tối thiểu. Họ sử dụng một ống nghiệm hình chữ U, giữa 2 nhánh là một màng ngăn có khe hở $0,5\mu$ (vi khuẩn *Salmonella* không đi qua được). Cho mỗi chủng *Salmonella* vào một nhánh của ống nghiệm hình chữ U và cho phage; ủ ấm. Sau đó lấy một số mẫu ở mỗi nhánh ra nuôi cấy; kết quả cho thấy có vi khuẩn phát triển trên môi trường tối thiểu với tần suất 10^{-4} . Điều này chứng tỏ: nhờ phage qua được màng lọc mà alen *try^+* của chủng try^+his^- được tải sang và nạp vào vi khuẩn nhận try^-his^+ hoặc alen *his^+* của vi khuẩn try^-his^+ được tải nạp vào vi khuẩn try^+his^- và trở thành try^+his^+ .

Các loại tải nạp:

- Tải nạp hạn chế và đặc hiệu: Một phage nhất định chỉ mang được một gen nhất định từ vi khuẩn cho sang nạp vào vi khuẩn nhận, ví dụ phage λ chỉ mang gen *gal*.

- Tải nạp chung: Phage có thể mang bất kỳ một đoạn gen nào của vi khuẩn cho sang nạp vào vi khuẩn nhận, ví dụ phage P22 có thể chuyển những gen khác nhau của *Salmonella*.

Tải nạp chung hoàn chỉnh: đoạn gen mang sang được tích hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhận qua tái tổ hợp, do đó được nhân lên cùng nhiễm sắc thể và có mặt ở các thế hệ sau.

Tải nạp chung không hoàn chỉnh: Đoạn gen mang sang không được nạp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhận, do đó không cùng được nhân lên và chỉ nằm lại ở một tế bào con khi vi khuẩn phân chia. Đặc tính của gen được mang sang vẫn được biểu hiện ra kiểu hình song chỉ ở một tế bào duy nhất. Hiện tượng này hay gặp hơn tải nạp hoàn chỉnh.

1.5.3. Do plasmid

Định nghĩa: Plasmid là những phân tử ADN dạng vòng tròn nằm ngoài nhiễm sắc thể và có khả năng tự nhân lên.

Sự nhân lên của plasmid phối hợp nhịp nhàng với sự nhân lên của nhiễm sắc thể, nhờ đó mà số lượng plasmid/nhiễm sắc thể ở tế bào con luôn ổn định và giống tế bào mẹ.

Độ lớn của plasmid: Nhỏ hơn nhiễm sắc thể, lớn nhất cũng nhỏ hơn 10^{-1} và nhỏ nhất cũng lớn hơn 10^{-4} độ lớn của nhiễm sắc thể, thường là khoảng 10^{-3} - 10^{-2} , tức là khoảng từ 2-120 Kb (kilobase).

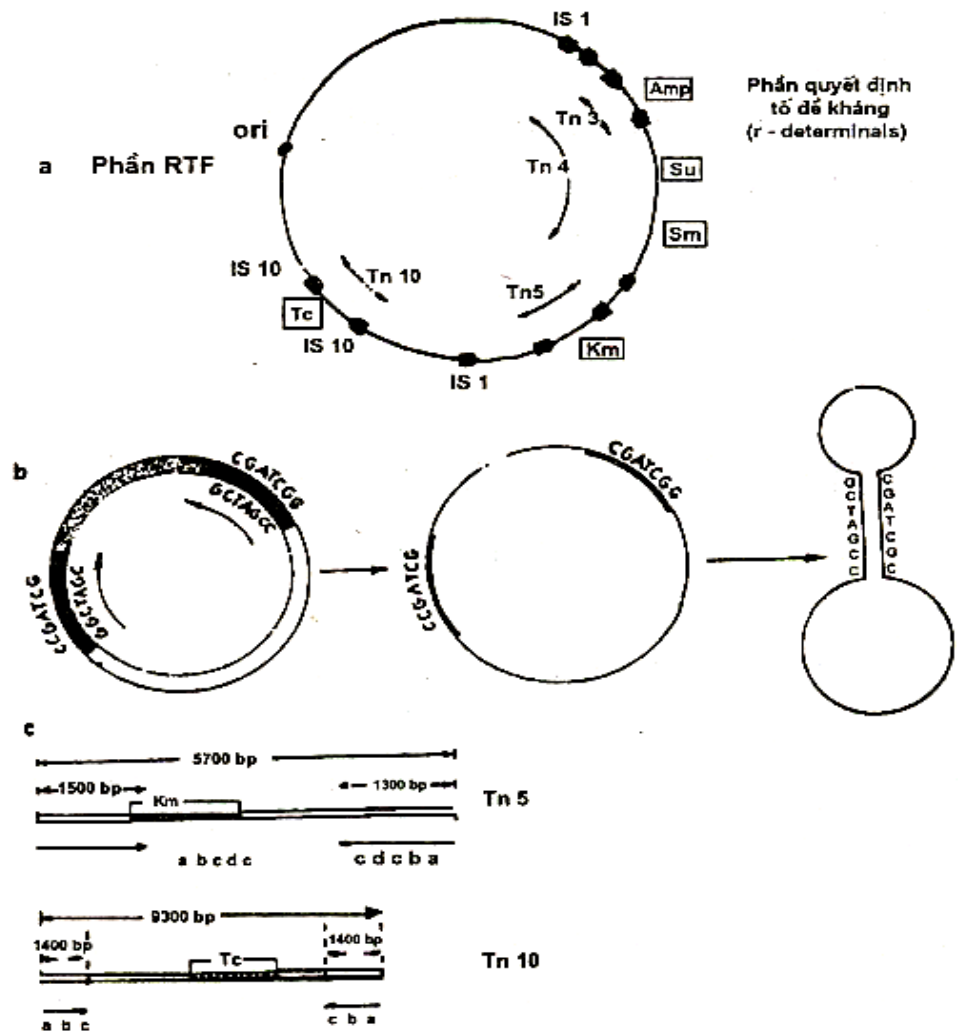
Số lượng các bản sao (copy number) của plasmid trong một tế bào có khác nhau; plasmid với trọng lượng phân tử lớn thì có ít bản sao, ví dụ plasmid R1 có trọng lượng 58 MD (megadalton) chỉ có 3-4 bản sao; plasmid với trọng lượng phân tử nhỏ thì có thể có nhiều bản sao hơn, ví dụ pBR322 nặng 3 MD có 10 -15 bản sao.

Plasmid chứa các gen mã hoá nhiều đặc tính khác nhau không thiết yếu cho sự sống của tế bào nhưng có thể giúp cho tế bào chủ tồn tại được dưới áp lực của chọn lọc. Ví dụ, vi khuẩn có R-plasmid sẽ tồn tại được trong môi trường có kháng sinh, trong khi các vi khuẩn nhạy cảm không có R-plasmid sẽ bị kháng sinh tiêu diệt. Một số plasmid có vai trò quan trọng trong vi sinh y học là plasmid mang các gen đề kháng kháng sinh và kim loại nặng (gọi là Resistance-plasmid = R-plasmid), plasmid sinh độc tố (enterotoxin, colicin, haemolysin), plasmid chứa yếu tố độc lực (khả năng bám dính, xâm nhập tế bào) hoặc yếu tố F (Fertility factor).

Một số plasmid lớn có thể mang bộ gen *tra* (transfer) hoặc RTF (Resistance

Transfer Factor) sẽ có khả năng tiếp hợp được với vi khuẩn khác và tự truyền chất liệu di truyền sang vi khuẩn nhận, gọi là những plasmid *tra*⁺ (hình ...a). Một số plasmid nhỏ không có bộ gen *tra* nhưng có thể có gen *mob* (mobilization) sẽ gắn được vào một plasmid *tra*⁺ nào đó và cùng được dẫn truyền (mobilization) sang vi khuẩn nhận. Các gen nằm trên plasmid cũng có thể được truyền sang vi khuẩn khác khi vi khuẩn bị ly giải, giải phóng plasmid-ADN (biến nạp) hoặc nhờ phage (tải nạp).

Như vậy chất liệu di truyền trên plasmid không những được truyền (dọc) qua các thế hệ mà còn có thể được lan truyền (ngang) từ vi khuẩn nọ sang vi khuẩn kia qua các hình thức tiếp hợp, biến nạp hoặc tải nạp. Hiện tượng tiếp hợp có thể xảy ra giữa các vi khuẩn cùng loại và khác loại như *E. coli* với *Shigella* hoặc *Salmonella* với *E. coli* hoặc *E. coli* với *Enterobacter*. Điều này có ý nghĩa đặc biệt quan trọng vì sự lan truyền các gen đề kháng nằm trên plasmid sẽ có cơ hội tạo ra sự đề kháng kháng sinh rất đa dạng và phức tạp.



Hình 1.19. Sơ đồ cấu tạo R- Plasmid và transposon

1.5.4. Do transposon

a. Cấu trúc một R-plasmid. Bên trái là phần RTF gồm một bộ gen tra tạo nên cầu giao phối và gen *ori* khởi đầu sao chép plasmid-ADN. Bên phải là phần các quyết định tố đề kháng ampicillin (Ap), sulfamid (Su), streptomycin (Sm), kanamycin (Km) và tetracyclin (Tc). Phần tô đậm với chiều mũi tên là những đoạn lặp lại ngược chiều nhau IR (inverted repeats), một số IR là những chuỗi gắn IS (insertion sequence) như IS1 hoặc IS10.

b. Sơ đồ thí nghiệm minh họa các đoạn lặp lại ngược chiều nhau: Sợi ADN biến tính thành sợi đơn và hai chuỗi nucleotid của đoạn IR bổ sung nhau sẽ liên kết với nhau qua cầu hydro tạo thành những “nơ” ADN.

c. Cấu trúc phân tử transposon Tn5 và Tn10 (bp: cặp base)

Transposon (transposable elements - gen nhảy) là những đoạn ADN chứa một hay nhiều gen, có hai đầu tận cùng là những chuỗi nucleotid lặp lại ngược chiều nhau (inverted repeats), có thể chuyển vị trí (transposition) từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác; ví dụ từ plasmid vào nhiễm sắc thể và ngược lại hoặc từ plasmid này sang plasmid khác.

Đặc biệt quan trọng đối với vi sinh y học là những transposon mang các gen đề kháng, như Tn3 mang gen kháng ampicillin, Tn5 có gen kháng kanamycin, Tn10 chứa gen kháng tetracyclin hoặc Tn4 mang 3 gen kháng ampicillin, streptomycin và sulfamid.

Do khả năng lan truyền đặc biệt này của transposon mà sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn càng có nguy cơ phức tạp và nguy hiểm hơn.

2. Virus

2.1. Đặc điểm sinh học

2.1.1. Hình thể

Virus thường có dạng hình cầu, một số có hình trụ, hoặc hỗn hợp hai hình trên. Kích thước rất thay đổi giữa các loại virus, đường kính từ 20nm đến 300nm.

2.1.2. Cấu trúc

- Cấu trúc cơ bản

Acid nucleic

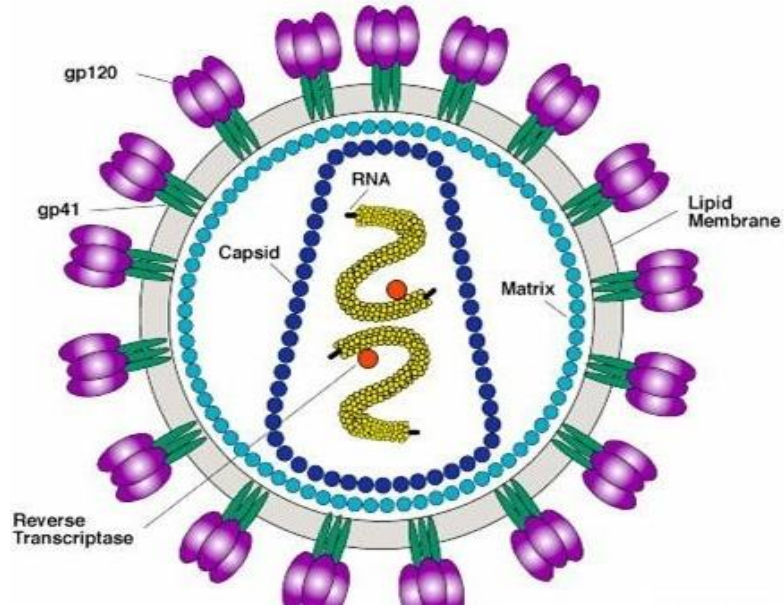
Virus chỉ có một trong hai loại là ADN hoặc ARN, hai sợi hoặc một sợi, thẳng hay vòng. Đây là vật liệu chứa thông tin di truyền của virus.

Capsid

Capsid là lớp vỏ protein bao bên ngoài lõi virus, bao gồm nhiều tiểu đơn vị gọi là capsomer, mỗi capsomer do một hoặc một vài phân tử protein. Tùy theo cách sắp xếp của capsomer mà hạt virus có đối xứng hình khối đa diện nhiều mặt hoặc hình khối xoáy chôn ốc. Capsomer sắp xếp dựa trên khung acid nucleic.

Các chức năng của capsid:

- Bảo vệ vật liệu di truyền là ADN hoặc ARN.
- Quyết định tính chất hấp phụ đặc hiệu với phân tử tiếp nhận của tế bào cảm thụ, từ đó quyết định tính gây nhiễm đặc hiệu cho loại tế bào và loài động thực vật.
- Một số virus lớp vỏ capsid trong gắn với acid nucleic polymerase phục vụ cho sự nhân lên của virus.
- Capsid là những kháng nguyên quan trọng trong phân loại virus.
- Capsid giữ cho hình dạng của virus không thay đổi.



Hình 2.1. Cấu trúc của HIV

- Cấu trúc riêng

Envelope

Chỉ có ở một số loại virus lớn hơn. Nó thường tạo thành từ hai loại protein: lipoprotein virus lấy từ màng sinh chất tế bào chủ khi giải phóng ra khỏi tế bào và glycoprotein là đặc hiệu của virus. Glycoprotein tạo thành các gai nhú trên bề mặt virus. Đây cũng là các phân tử quyết định sự hấp phụ đặc hiệu lên trên các receptor của tế bào chủ. Trong một số loại virus, giữa capsid và envelope còn có một protein khác gọi là matrix. Envelope là kháng nguyên quan trọng để phân loại các virus có lớp vỏ này và ổn định hình dạng của virus.

Enzym cấu trúc

Virus không có enzym chuyên hoá và năng lượng vì thế nó ký sinh bắt buộc bên trong tế bào. Một số virus lớn hơn có enzym phục vụ cho sự nhân lên của virus, như ADN-polymease, ARN-polymease...

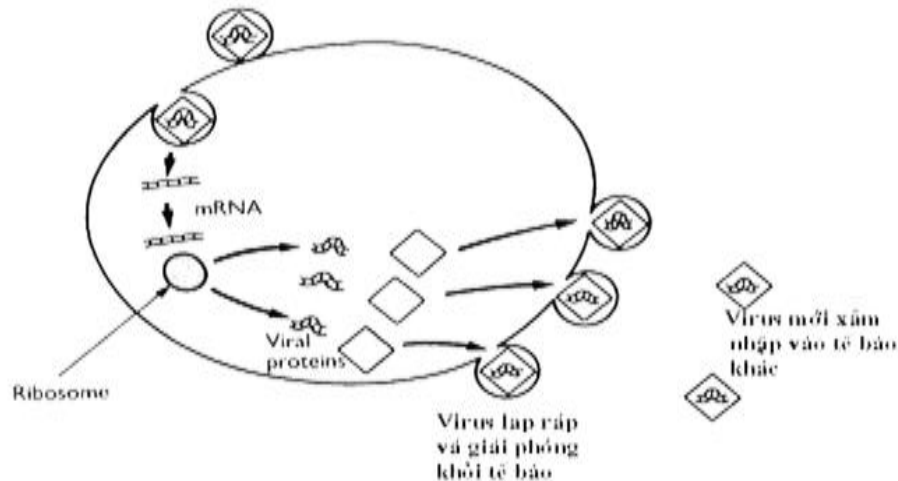
2.2. Sự nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ và hậu quả của sự nhân lên trong tế bào cảm thụ

2.2.1. Sự nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ

Để nhân lên bên trong tế bào chủ, các virus phải trải qua 6 giai đoạn sau đây:

- Virus hấp phụ (bám) lên bề mặt tế bào chủ nhờ trên tế bào có các phân tử tiếp nhận đặc hiệu với phân tử trên bề mặt virus.
- Virus xâm nhập vào tế bào do sự ẩm bào hoặc enzym virus phá thủng màng tế bào... hạt virus chui được vào bên trong tế bào.

- Virus chui ra khỏi capsid (decapsid), những virus xâm nhập vào tế bào cả capsid, lõi của chúng cần chui ra khỏi capsid thường do enzym của tế bào phân huỷ capsid.
- Tổng hợp các thành phần cấu trúc của hạt virus. Đây là một giai đoạn phức tạp nhất, tùy thuộc vào loại acid nucleic virus, vào virus có hay không enzym. Nhưng nói chung sự tổng hợp này bao gồm hai giai đoạn lớn là tổng hợp acid nhân và tổng hợp các thành phần cấu trúc khác.



Hình 2.3. Sự nhân lên của virus trong tế bào

- Lắp ráp các thành phần cấu trúc tạo thành hạt virus hoàn chỉnh.
 - Giải phóng các hạt virus ra khỏi tế bào theo cách huỷ màng tế bào hoặc nảy chồi.
- Đây là các giai đoạn chung cho mọi virus, các chi tiết có khác nhau cho từng loại virus phụ thuộc vào acid nucleic và enzym cấu trúc mà virus có.

2.2.2. Hậu quả của sự nhân lên trong tế bào cảm thụ

Virus vào trong tế bào chủ có thể gây ra nhiều hậu quả khác nhau:

Virus nhân lên và phá huỷ tế bào

Đây là hậu quả phổ biến và chính hậu quả này dẫn tới gây bệnh cho cơ thể. Các tế bào bị phá huỷ giải phóng ra các virus mới. Các virus này lại xâm nhập vào các tế bào mới, nhân lên dẫn tới phá huỷ rất nhiều tế bào và bệnh nhiễm virus xuất hiện.

Nhiễm trùng tiềm tàng (persistent infection)

Nhiều loại virus (herpes, adeno..) gây nhiễm tế bào chỉ nhân lên rất ít không gây bệnh lý tức thì, nhưng tồn tại trong cơ thể ở một số tế bào nào đấy rất dài, gây ra nhiễm trùng duy trì.

Nhiễm trùng chậm (slow infection)

Nhóm Lentivirus (HIV là thành viên) có thời gian ủ bệnh trong nhiều năm.

Gây các khối u và ung thư

Một số loại virus sau khi xâm nhập vào tế bào không nhân lên mà tích hợp ADN của

virus (hoặc ADN trung gian của virus) vào ADN của tế bào, gây ra chuyển dạng tế bào. Đó là các u lành hoặc u ác tính.

Gây ra dị tật bẩm sinh

Nhiễm virus trong ba tháng đầu của thai nghén thường dẫn đến thai chết lưu hoặc dị tật bẩm sinh.

2.3. Phân loại virus

2.3.1. Phân loại theo triệu chứng lâm sàng

Cách phân loại này dễ cho lâm sàng và đã có từ lâu, nhưng không chính xác. Vì một loại virus có thể gây ra một số bệnh cho một số cơ quan.

- Các virus gây bệnh phổ biến: là những virus lây lan theo đường máu, như sốt xuất huyết, sốt vàng, viêm não...

- Các virus gây bệnh thần kinh là những virus gây bệnh cho não, tuỷ sống như virus bại liệt, dại...

- Các virus gây bệnh đường hô hấp như virus cúm, á cúm, sởi, RSV...

- Các virus gây bệnh đường tiêu hoá như virus rota, ECHO, Coxsackie, Adeno..

- Các virus viêm gan như virus viêm gan A, B, C, D và E.

- Các virus gây bệnh ở mắt như virus adeno, herpes...

- Các virus lây lan theo đường tình dục như HIV, Cytomegallo virus, papilloma virus...

2.3.2. Phân loại theo cấu trúc

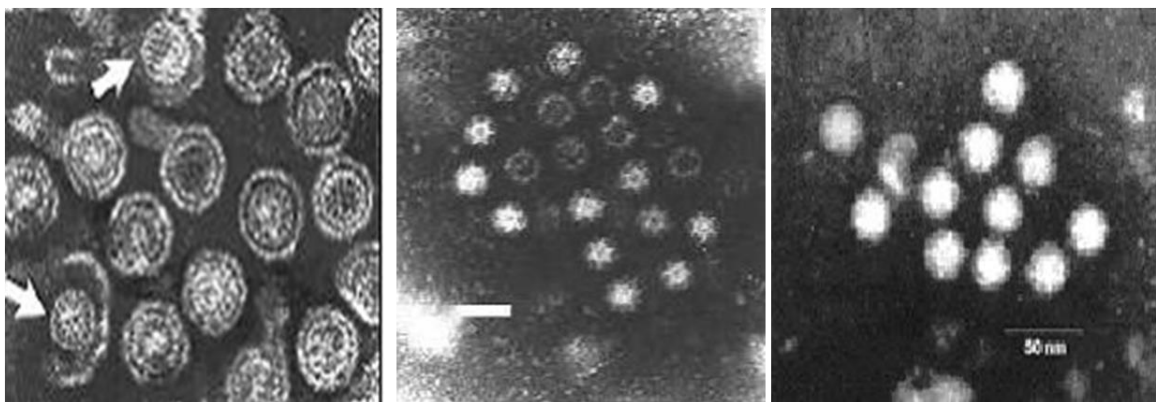
Các phân loại này dựa trên các thành phần cấu trúc, theo trình tự:

- Acid nucleic: ADN hoặc ARN,

- Có vỏ envelope hoặc không,

- Kích thước từ lớn đến bé dần,

- Đối xứng hình khối hay xoáy chôn ốc.



(a)

(b)

(c)

Hình 2.3. ảnh chụp một số virus

(a) Virus viêm gan B, (b) Calicivirus, (c) Astrovirus

3. Chẩn đoán vi sinh

3.1. Bệnh phẩm

- Máu tĩnh mạch

3.2. Chẩn đoán trực tiếp

- Nuôi cấy phân lập trên tế bào hoặc trong động vật thực nghiệm. Xác định virus thường dùng các kỹ thuật miễn dịch.

- Phát hiện virus hoặc kháng nguyên của virus trong các bệnh phẩm bằng kính hiển vi điện tử, bằng các kỹ thuật miễn dịch trực tiếp hoặc bằng một số kỹ thuật di truyền (PCR...). Đây là loại phương được sử dụng nhiều nhất hiện nay, vì nhanh và chính xác hơn hai loại phương pháp trên

3.3. Chẩn đoán gián tiếp

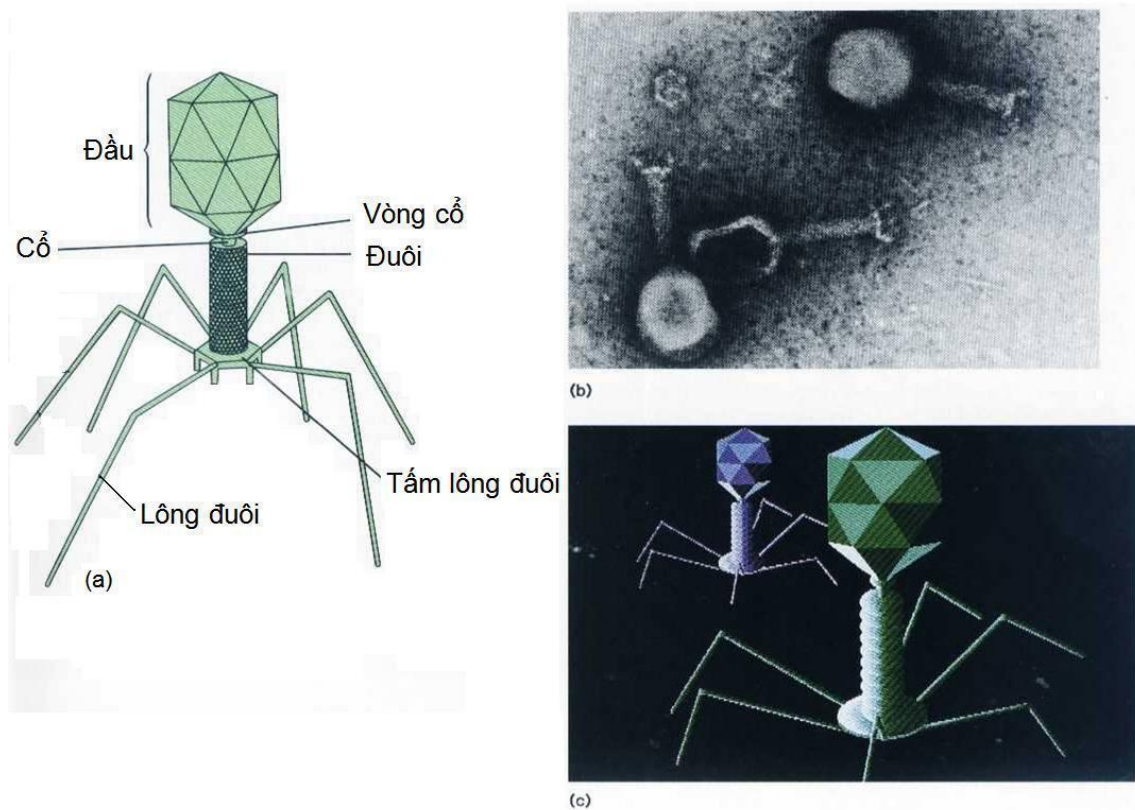
- Chẩn đoán huyết thanh học: Phát hiện kháng thể chống virus trong máu bệnh nhân bằng các kỹ thuật miễn dịch.

4. Phage

4.1. Cấu trúc

Phage là loại virus có cấu trúc hỗn hợp, nó vừa có cấu trúc hình khối (đầu), vừa có cấu trúc hình xoắn (đuôi). Phage có 3 phần (Hình 29, 30).

Đầu phage có cấu trúc hình khối, hình thái như cái hộp lục lăng được hợp bởi nhiều capsomer, bên trong chứa acid nucleic, hầu hết các phage chứa ADN còn lại rất ít phage chứa ARN. Acid nucleic ở đầu phage là một sợi rất dài được sắp xếp rất gọn và tối ưu nhất. Acid nucleic chiếm tới 40% toàn bộ trọng lượng của phage. Đầu phage có đường kính 65 nm và chiều dài khoảng 95 nm.



Hình 2.4.. Bacteriophage

(a) Cấu trúc của phage T4, (b) ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử

(c) ảnh màu vi tính của phage T2

Đuôi có cấu trúc dạng hình xoắn, có độ dài 95 nm nối liền với một đỉnh của đầu. Đuôi này được hợp bởi 2 ống hình trụ lồng vào nhau: ống bên trong cứng có đường kính 8 nm thông với khoang đầu, ống bên ngoài hình xoắn có đường kính 20 nm co giãn được theo chiều dọc như cái lò xo. Phía cuối đuôi là một tấm lông đuôi 6 cạnh đều nhau có đường kính khoảng 35 nm.

Phage có 6 lông đuôi, mỗi lông đuôi có độ dài 150 nm được gắn vào mỗi đỉnh của tấm cuối đuôi. Lông đuôi giúp cho phage bám vào được tế bào vi khuẩn.

4.2. Sự nhân lên của phago

Phage là virus do đó nó cũng nhân lên theo quy luật chung của virus. Trong một hoàn cảnh nhất định nào đấy, phage cố định vào receptor của vách tế bào bằng những sợi lông đuôi của nó. Mỗi loại phage chỉ có thể cố định vào được một loại vi khuẩn vì phage có tính chất đặc hiệu tít đối với vi khuẩn.

Sau khi bám vào được tế bào vi khuẩn, phage đã dùng lysozym có ở cuối đuôi phá hủy màng tế bào tạo thành lỗ thủng. Ống cứng bên trong của đuôi được xuyên vào bào tương của vi khuẩn nhờ sự co lại của ống bên ngoài đuôi. Ngay sau đó, acid nucleic ở đầu phage được bơm vào bên trong tế bào vi khuẩn. Vỏ của phage ở lại bên

ngoài rồi tự tiêu hủy.

4.3. Phân loại

Phage được chia thành 2 loại: Phage độc lực và phage ôn hòa.

Phage độc lực là loại phage khi xâm nhập vào tế bào vi khuẩn thì chúng có khả năng nhân lên và phá hủy tế bào vi khuẩn đó.

Phage ôn hòa còn được gọi là tiền phage hay prophage, loại phage này khi xâm nhập vào vi khuẩn thì acid nucleic của nó gắn vào genom của vi khuẩn, tồn tại và phân chia cùng genom của vi khuẩn qua nhiều thế hệ. Khi gặp điều kiện thích hợp thì acid nucleic của phage được hoạt hóa, chỉ huy toàn bộ quá trình nhân lên, tạo ra các phage mới và gây tổn hại cho tế bào vi khuẩn như phage độc lực. Những vi khuẩn mang phage ôn hòa gọi là vi khuẩn tiềm tan hay tế bào sinh dung giải. Gen của prophage có thể tạo ra một số thay đổi đặc tính của vi khuẩn như tạo ra ngoại độc tố (vi khuẩn bạch hầu, liên cầu).

4.4. Ứng dụng phago

- Chẩn đoán và phân loại vi khuẩn

Mỗi loại vi khuẩn có một loại phage tương ứng gây bệnh hay nói cách khác phage có tính đặc hiệu đối với vi khuẩn. Trong chẩn đoán và phân loại một số vi khuẩn như vi khuẩn dịch hạch, tụ cầu... người ta dùng phage đã biết tên trước cho tiếp xúc với vi khuẩn đang cần xác định, nếu đặc hiệu (cùng tên) thì tế bào vi khuẩn sẽ bị phage gây bệnh làm phá hủy tế bào vi khuẩn đó. Đây là cách chẩn đoán, phân loại nhanh và đặc hiệu cao.

- Làm mẫu nghiên cứu về sinh học phân tử.

Trong sinh học phân tử, đặc biệt là trong di truyền vi khuẩn, người ta đã dùng phage ôn hòa để nghiên cứu về sự tải nạp (transduction) của vi khuẩn. Tải nạp là quá trình vận chuyển chất liệu di truyền từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận thông qua phage. Đây cũng là kỹ thuật được sử dụng nhiều trong công nghệ sinh học.

- Phòng và điều trị bệnh do vi khuẩn

Trong một số bệnh do vi khuẩn gây ra, ví dụ như bệnh lỵ, người ta đã cho bệnh nhân uống phage đặc hiệu của vi khuẩn có nguy cơ gây bệnh hoặc đang gây bệnh để phòng và điều trị. Phương pháp này có hiệu quả cao nhưng khó thực hiện và tốn kém.

- Phát hiện phóng xạ.

Những tế bào vi khuẩn tiềm tan thường bị ly giải khi có tác dụng của chất phóng xạ, bởi vậy người ta dùng những tế bào tiềm tan đó cho tiếp xúc với môi trường hoặc những chất nghi bị nhiễm phóng xạ, nếu tế bào vi khuẩn bị ly giải có nghĩa là môi trường hoặc những chất đó đã bị nhiễm phóng xạ.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1 Hình thể của nhóm vi khuẩn nào có khuynh hướng xếp thành hình đặc biệt

- A. Trực khuẩn gram (+)
- B. Cầu khuẩn
- C. Trực khuẩn gram (-)
- D. Xoắn khuẩn
- E. Trực khuẩn đường ruột .

2 Các thành phần cấu tạo chính của vi khuẩn

- A. Nhân, chất nguyên sinh, màng nguyên sinh, vỏ.
- B. Nhân, màng nguyên sinh, vách, vỏ.
- C. ADN, nguyên sinh chất, màng sinh chất
- D. ARN chất nguyên sinh, màng sinh chất, vách.
- E. Nhân, chất nguyên sinh, màng nguyên sinh, vách .

3 Các thành phần có thể có trong cấu trúc của vi khuẩn

- A. Vỏ, lông, vách, nha bào
- B. Vỏ, lông, pili, nha bào.
- C. Vỏ, lông, enzym, vách.
- D. Vỏ, lông, nha bào, độc tố.

4 Kích thước trung bình của vi khuẩn

- A. 1 - 2 μ m
- B. 10 - 300 nm
- C. 300 μ m
- D. < 10nm
- E. >300 μ m

5 Các yếu tố có liên quan đến sự nhận biết hình thể vi khuẩn là

- A. Hình dạng, sự sắp xếp tế bào, tính chất bắt màu.
- B. Kích thước, hình dạng, tính chất bắt màu.
- C. Hình dạng, vỏ, tính chất bắt màu.
- D. Kích thước, hình dạng, vách .

6. Nha bào thường gặp ở nhóm vi khuẩn

- A. Cầu khuẩn gram (+)
- B. Trực khuẩn gram (-)
- C. Trực khuẩn gram (+)
- D. Cầu khuẩn gram (+)

E. Xoắn khuẩn .

7. Cơ chế tác dụng của kháng sinh nhóm β - lactam

A. Ức chế quá trình tổng hợp acid nhân.

B. Ức chế tổng hợp tiểu phần 50 S của ribosom, dẫn tới ức chế tổng hợp protein.

C. Ức chế tổng hợp tiểu phần 30 S của ribosom, dẫn tới ức chế tổng hợp protein.

D. Rối loạn chức năng màng nguyên sinh .

E. Ức chế tổng hợp vách vi khuẩn, dẫn tới ức chế tổng hợp protein.

8. Sử dụng huyết thanh miễn dịch trong trường hợp

A. Phòng bệnh khẩn cấp và điều trị

B. Phòng bệnh và điều trị .

C. Điều trị dự phòng.

D. Phòng bệnh.

9. Nguyên lý phòng bệnh của vaccin

A. Dùng kháng thể đưa vào cơ thể tạo miễn dịch chủ động

B. Dùng kháng thể đưa vào cơ thể để tạo miễn dịch thụ động .

C. Dùng kháng nguyên đã mất độc để kích thích cơ thể tạo ra miễn dịch chủ động.

D. Dùng kháng nguyên đã bất hoạt để kích thích cơ thể tạo miễn dịch thụ động.

E. Dùng kháng nguyên và kháng thể để đưa vào cơ thể tạo miễn dịch chủ động.

10. Môi trường thích hợp để nuôi cấy virus

A. Động vật cảm thụ

D. Thạch máu

C. Canh thang

D. Thạch thường

11. Cấu trúc của virus có đặc điểm

A. Chỉ có 1 trong 2 loại acid nhân

B. Có cấu trúc như một tế bào bậc thấp

C. Có cả 2 loại acid nhân

D. Có cấu trúc của một tế bào hoàn chỉnh.

Bài 2. ĐẠI CƯƠNG MIỄN DỊCH VI SINH VẬT

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày được các thành phần kháng nguyên của vi khuẩn và virus.
- Giải thích được vai trò của các yếu tố độc lực của vi sinh vật đối với khả năng gây bệnh của vi khuẩn.
- Mô tả được các hàng rào của hệ thống phòng ngự không đặc hiệu và vai trò của kháng thể, lympho T trong chống nhiễm trùng.
- Trình bày nguyên lý, phân loại và nguyên tắc sử dụng của vaccine và huyết thanh miễn dịch.
- Trình bày được nguyên lý và giải thích được sơ đồ của các phản ứng kết hợp KN-KT thường được sử dụng trong vi sinh y học.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Kháng nguyên

1.1. Định nghĩa

Kháng nguyên là những chất lạ khi xuất hiện trong cơ thể thì kích thích cơ thể sinh ra kháng thể hay gây ra đáp ứng miễn dịch và kết hợp đặc hiệu với những sản phẩm của sự kích thích đó.

1.2. Tính chất

- Tính sinh miễn dịch (immunogenicity) là khả năng kích thích cơ thể tạo ra đáp ứng miễn dịch.
- Tính đặc hiệu (specificity) là khả năng kết hợp đặc hiệu của kháng nguyên với kháng thể mà nó đã kích thích tạo ra.

1.3. Kháng nguyên của vi khuẩn

1.3.1. Ngoại độc tố

Một số vi khuẩn có ngoại độc tố (tả, *Shigella shiga*, uốn ván, hoại thư, tụ cầu vàng...).

Đây là những chất độc có độc lực cao, do các vi khuẩn tiết ra bên ngoài tế bào.

Về bản chất hoá học ngoại độc tố là những protein hoặc polipeptit, nên chúng có tính

kháng nguyên mạnh. Tuy nhiên một số ngoại độc tố là những chuỗi ngắn polipeptit và có thêm một số đường đơn hoặc lipid, nên tính kháng nguyên của chúng yếu và tính chịu nhiệt của chúng cao hơn. Ví dụ độc tố ruột của tụ cầu vàng.

1.3.2. Kháng nguyên enzym

Ngoài enzym nội bào, một số vi khuẩn còn có enzym ngoại bào. Loại enzym này gồm hai loại: enzym chuyển hóa và enzym độc lực. Ở một số vi khuẩn có các enzym độc lực như hyaluronidase, leucosidin, hemolysin, coagulase.... Các enzym này có tính kháng nguyên tốt và kích thích tạo thành các kháng thể đặc hiệu. Một số kháng nguyên enzym cũng được sử dụng trong chẩn đoán. Ví dụ sử dụng streptolysin O của liên cầu nhóm A để chẩn đoán bệnh thấp bằng phản ứng ASLO.

1.3.3. Kháng nguyên vách tế bào (kháng nguyên thân O)

Trừ Mycoplasma, còn mọi vi khuẩn đều có vách.

- Vi khuẩn Gram dương:

Ngoài lớp peptidoglycan, ở nhiều vi khuẩn Gram dương còn có thêm lớp acid teichoic bám bên ngoài. Acid này và/hoặc lớp polisaccarit tạo nên tính đặc hiệu kháng nguyên O.

Một số vi khuẩn còn có một số kháng nguyên khác bao ngoài lớp acid teichoic và polisaccarit, như protein M (của liên cầu hoặc phế cầu), protein A (của tụ cầu vàng), hoặc lớp sáp (của Mycobacterium)...

- Vi khuẩn Gram âm:

Cấu trúc kháng nguyên của vách vi khuẩn Gram âm phức tạp hơn các vi khuẩn Gram dương, nhưng giữa các vi khuẩn Gram âm có các lớp kháng nguyên vách gần như nhau. Tính đặc hiệu được quyết định bởi lớp polisaccarit ngoài cùng.

1.3.4. Kháng nguyên vỏ (kháng nguyên K - kapsule)

Một số vi khuẩn có vỏ bao bên ngoài vách tế bào, như: phế cầu, H. influenzae, dịch hạch, não mô cầu, than và một số vi khuẩn đường ruột.....

Bản chất hoá học của vỏ vi khuẩn có hai loại:

- Polipeptit, như vỏ của các vi khuẩn than, dịch hạch. Các polipeptit này được tổng hợp từ các acid amin dạng D.

- Polisaccarit là vỏ của các vi khuẩn còn lại.

1.3.5. Kháng nguyên lông (kháng nguyên H)

Nhiều trực khuẩn có lông, như các trực khuẩn đường ruột (trừ Shigella), phẩy khuẩn tả, Helobacter, trực khuẩn mũ xanh...

1.4. Kháng nguyên của virus

1.4.1. Kháng nguyên nucleoprotein

Acid nucleic đóng vai trò là hapten, nhưng nucleoprotein (acid nucleic cộng với capsid) là kháng nguyên hoàn toàn.

1.4.2. Kháng nguyên capsid

Đây là những kháng nguyên quan trọng, được dùng trong phân loại và sản xuất vaccin của nhiều virus, ví dụ các Picornavirus.

1.4.3. Kháng nguyên envelop

Vỏ envelop thường là glycoprotein của gai nhú cắm trên màng lipid. Gai nhú là thành phần quan trọng của một số loại vaccin, như HIV, các Myxovirus...

2. Kháng thể

2.1. Định nghĩa

Kháng thể hay globulin là chất do cơ thể sinh ra dưới sự kích thích của kháng nguyên và có khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên

2.2. Các loại kháng thể

Kháng thể là các globulin miễn dịch (Ig: Immunoglobulin). Chia 5 loại

- IgM: là globulin có phân tử lớn nhất, xuất hiện sớm nhất khi tiếp xúc với kháng nguyên.
- IgG: chiếm 80% lượng kháng thể có trong cơ thể, thời gian tồn tại lâu nhất (20- 28 ngày), qua được rau thai. Xuất hiện muộn hơn IgM và thay thế IgM.
- IgA có 2 loại IgA trong huyết thanh và IgA tiết tại chỗ.
- IgE có trong huyết thanh người bình thường với tỷ lệ rất thấp.
- IgD có trong huyết thanh người bình thường với tỷ lệ rất thấp và chưa có nhiều hiểu biết về IgD

2.3. Chức năng của kháng thể

- Giúp bạch cầu trong việc thực bào
- Giết chết vi khuẩn nhờ kết hợp với hệ thống bổ thể
- Ngăn chặn sự xâm nhập của vi khuẩn và virus
- Trung hòa độc tố của vi khuẩn, ngưng kết các vi sinh vật gây bệnh và làm tan vi khuẩn gram (-).

3. Nhiễm trùng và các yếu tố độc lực của vi sinh vật

3.1. Một số khái niệm

- Định nghĩa về nhiễm trùng

Là xâm nhập và sinh sản trong mô của các vi sinh vật gây bệnh dẫn đến sự xuất hiện hay không xuất hiện bệnh nhiễm trùng

- Các hình thái nhiễm trùng
- + Bệnh nhiễm trùng cấp tính và mạn tính

- + Nhiễm trùng thể ẩn
- + Nhiễm trùng tiềm tàng
- + Nhiễm trùng chậm

3.2. Độc lực của vi sinh vật và đơn vị đo độc lực

- Độc lực (virulence) là mức độ của khả năng gây bệnh của vi sinh vật
- MLD (minimal lethal dose – liều chết tối thiểu), LD 50 (50% letal dose)

3.3. Các yếu tố độc lực của VSV

- Sự bám: do pili, fimbriae, polysaccharid bề mặt, yếu tố bám và độc lực
- Sự xâm nhập và sinh sản
- Độc tố
- Enzym ngoại bào
- Kháng nguyên bề mặt
- Các phản ứng quá mẫn
- Độc lực của virus
- Sự né tránh đáp ứng miễn dịch

3.4. Đường lây truyền vi khuẩn gây bệnh

Từ một người bị bệnh, bằng cách nào mà người khác có thể bị lây nhiễm bệnh đó? Nó có thể là do lây trực tiếp từ người bệnh sang người lành hoặc qua môi giới trung gian.

Đường lây truyền trực tiếp từ người bệnh sang người lành có thể do tiếp xúc trực tiếp qua đường sinh dục (như giang mai, lậu, AIDS ...) hay qua vết cắn của động vật bị bệnh (chó dại ...) hoặc khi tay, chân có/bị thương tổn mà tiếp xúc với động vật bị bệnh hay chất thải của súc vật có vi khuẩn gây bệnh (như than, uốn ván ...).

Đường lây truyền từ người bệnh sang người lành có thể thông qua môi trường không khí (bệnh đường hô hấp), qua thức ăn, nước uống (bệnh đường tiêu hoá), qua các dụng cụ thăm khám, chữa bệnh (nhiễm trùng bệnh viện) hoặc qua côn trùng tiết tó (bọ chét, chấy rận, muỗi).

4. Sự đề kháng của cơ thể với vi sinh vật

4.1. Hệ thống phòng ngự tự nhiên (Miễn dịch tự nhiên, miễn dịch không đặc hiệu)

4.1.1. Hàng rào da và niêm mạc

Đây là hàng rào đầu tiên chống lại sự xâm nhập của các vi sinh vật bằng các cơ chế sau:

Cơ chế vật lý

Với lớp da gồm nhiều lớp tế bào và lớp niêm mạc được phủ bởi lớp màng nhầy đã ngăn cản sự xâm nhập của nhiều vi sinh vật.

Sự bài tiết các chất như mồ hôi, nước mắt và các dịch trên niêm mạc, đã tăng cường khả năng bảo vệ của lớp áo này.

Cơ chế hóa học

- pH: pH của dạ dày (=3) là hàng rào lớn nhất trên đường tiêu hóa. Phần lớn các VSV theo thức ăn và nước uống bị diệt tại đây. pH của da và âm đạo khoảng 4, là pH không thích hợp cho phần lớn các vi sinh vật gây bệnh phát triển.

- Lysozym là một enzym thủy phân liên kết vách vi khuẩn. Enzym này được bài tiết nhiều từ các tuyến của niêm mạc, nước mắt và nước miếng.

- Spermin có trong tinh dịch và có tác dụng diệt khuẩn.

- Trên da còn có một số acid béo không bão hòa, có tác dụng chống lại một số vi khuẩn gây bệnh.

Cơ chế cạnh tranh

Trên da và niêm mạc có nhiều vi sinh vật cư trú và chúng tạo thành các hệ sinh thái. Các hệ sinh thái này có sự khác nhau giữa các vùng da và các khoang của cơ thể, do sự phân bố của các vi sinh vật khác nhau giữa các vùng. Khi các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập vào da và niêm mạc, chúng sẽ bị sự cạnh tranh chỗ bám (receptor) của các vi sinh vật tại chỗ và chính điều này tạo nên sự bảo vệ cho cơ thể.

Da và niêm mạc là hàng rào bảo vệ đầu tiên, nếu hàng rào này bị tổn thương thì nhiều vi sinh vật có thể xuyên qua để đi sâu vào cơ thể và tất nhiên chúng sẽ gặp hàng rào tế bào.

4.1.2. Hàng rào tế bào

Hàng rào này bao gồm các tế bào thực bào (đơn nhân, đại thực bào và bạch cầu trung tính) và tế bào diệt tự nhiên:

- *Bạch cầu có nhân đoạn (bạch cầu đa nhân trung tính còn gọi là tiểu thực bào)*

Là đội quân cơ động có trong máu và hệ bạch huyết. Nhiệm vụ của nó là bắt và tiêu hóa các vi sinh vật. Còn sự tiêu hóa của các vi sinh vật là nhờ các enzym có trong các lysosom và còn có thể do một số anion được sinh ra do quá trình hô hấp tế bào. Nó chỉ bắt và tiêu hóa được các vật lạ có kích thước bé nên gọi là tiểu thực bào.

- *Các tế bào đơn nhân thực bào và đại thực bào*

Loại tế bào này khi ở trong máu thì gọi là tế bào đơn nhân (monocyte), nhưng khi ở trong các tổ chức thì gọi là đại thực bào (macrophage) với các tên khác nhau tùy theo tổ chức mà nó cư trú (ở gan gọi là tế bào Kuffer, ở hạch lympho gọi là đại thực bào tự do và cố định...). Sở dĩ gọi là đại thực bào vì nó có thể bắt được các dị vật lớn như bụi than...

Đại thực bào có các vai trò sau:

- + Bắt và tiêu hóa các vi sinh vật (giống ở bạch cầu trung tính)
- + Trình diện kháng nguyên cho các tế bào miễn dịch gây ra phản ứng miễn dịch.
- + Tham gia vào miễn dịch tế bào bởi cơ chế không đặc hiệu.
- + Bài tiết các yếu tố bảo vệ: bổ thể, interferon, lysosym và một số yếu tố kích thích phân bào khác.

- *Tế bào diệt tự nhiên (Natural killer - NK)*

Loại tế bào này tìm thấy ở máu ngoại vi của đa số người. Các tế bào đích có thể là tế bào bị nhiễm virus hoặc tế bào ung thư. Tác dụng diệt tế bào đích rất rõ với NK khi tế bào đích nhiễm các virus hoặc tế bào ác tính. Hoạt tính này tăng lên khi NK bị kích thích bởi interferon....

4.1.3. Hàng rào thể dịch

Các yếu tố bảo vệ sẵn có trong máu và các dịch của cơ thể là bổ thể, propeccidin, interferon và các kháng thể tự nhiên.

Interferon là do tế bào nhiễm virus tạo ra, có tác dụng ức chế tổng hợp mARN và được sử dụng như một chất điều trị không đặc hiệu virus.

Kháng thể tự nhiên (natural antibody)

Kháng thể tự nhiên là những kháng thể sẵn có trong máu. Tuy với số lượng rất ít, nhưng kháng thể này đã làm tăng sự đề kháng đáng kể với kháng nguyên tương ứng hoặc kháng nguyên chéo.

4.1.4. Miễn dịch chủng loại

Miễn dịch đặc hiệu có 2 loại là miễn dịch dịch thể (kháng thể) và miễn dịch tế bào (lympho T).

Hệ thống miễn dịch đặc hiệu có được khi cơ thể đã tiếp xúc với một vi sinh vật gây bệnh nào đó (do nhiễm trùng hoặc do dùng vaccin), sau đó có được sự đề kháng với vi sinh vật đó. Vậy sự tiếp xúc của cơ thể người với vi sinh vật hay các kháng nguyên của vi sinh vật sẽ có được miễn dịch chống lại vi sinh vật đó. Vì vậy nên được gọi là miễn dịch thu được.

1.4.1. Miễn dịch dịch thể

Tất cả các cơ chế của kháng thể trong nhiễm trùng đều xuất phát từ chức năng cơ bản của kháng thể là kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên vi sinh vật. Sự kết hợp đặc hiệu này sẽ biểu hiện thành các cơ chế chống nhiễm trùng khác nhau:

- Ngăn cản sự bám của vi sinh vật vào niêm mạc

IgA tiết (IgAs) thường gắn trên niêm mạc đường hô hấp và tiêu hóa. kháng thể này có thể kết hợp đặc hiệu với các kháng nguyên VSV và ngăn cản VSV bám vào niêm

mạc hô hấp, tiêu hoá và sinh dục tiết niệu.

- Trung hòa độc lực của virus, Rickettsia, ngoại độc tố và enzym.

Các IgG, IgA và IgM khi kết hợp đặc hiệu với các kháng nguyên của virus, Rickettsia, ngoại độc tố và enzym và làm chúng mất khả năng gây bệnh.

- Làm tan các VSV

IgG và IgM khi kết hợp với kháng nguyên (là các VSV) đã hoạt hóa bổ thể dẫn tới làm tan các VK Gram âm, virus và tiêu diệt các VK Gram dương.

- Ngưng kết các VSV và kết tủa các sản phẩm hòa tan của các VSV

Các IgG, IgA và IgM khi kết hợp với các VSV đã gây nên sự ngưng kết các VSV này. Các loại kháng thể trên khi kết hợp với các sản phẩm hòa tan của các VSV cũng gây nên sự kết tủa các sản phẩm này.

- Làm tăng thực bào do sự opsonin hóa

Các IgG và IgM khi đã kết hợp với VSV và sản phẩm của chúng có thể hoạt hóa bổ thể. Phức hợp miễn dịch này làm dễ dàng cho các tế bào thực bào bắt (opsonin hóa) và tiêu hóa các kháng nguyên. Sở dĩ có hiện tượng này là do các tế bào thực bào có các phân tử tiếp nhận với Fc của IgG và C3b của bổ thể.

- Độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC: antibody dependent cytotoxic cell)

Các tế bào null và một loại tế bào NK (một dạng tế bào lympho, nhưng không phải lympho B và T) có đặc tính gắn Fc của IgG trên bề mặt tế bào này và phần Fab của kháng thể này vẫn có thể kết hợp đặc hiệu với các tế bào đích. Tế bào đích có thể là tế bào ung thư hoặc tế bào bị nhiễm virus với sự xuất hiện kháng nguyên đặc hiệu trên mặt các tế bào.

1.4.2. Miễn dịch tế bào

- Tế bào lympho Tc (T độc) có tác dụng tiêu diệt trực tiếp tế bào đích. Tế bào đích có thể là tế bào ác tính hoặc virus. (TCD8)

- Lympho T gây quá mẫn muộn (TDTH) sau khi nhận dạng được kháng nguyên đặc hiệu và các tế bào này sản xuất ra lymphokin và kích thích đại thực bào diệt các VSV nội sinh (TCD4)

Chức năng:

Đề kháng chống VSV nội bào

Đáp ứng miễn dịch với một số kháng nguyên hòa tan

Mẫn cảm do tiếp xúc

Phản ứng quá mẫn muộn

Một số bệnh tự miễn

4.2. Hệ thống phòng ngừa đặc hiệu (còn gọi là miễn dịch đặc hiệu, miễn dịch thu

được)

4.2.1. Các cơ chế bảo vệ của kháng thể trong chống nhiễm trùng

Tất cả các cơ chế của kháng thể trong chống nhiễm trùng đều xuất phát từ chức năng cơ bản của kháng thể là kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên (kháng nguyên) của các VSV. Sự kết hợp đặc hiệu này sẽ biểu hiện thành các cơ chế chống nhiễm trùng khác nhau:

- Ngăn cản sự bám của vi sinh vật vào các niêm mạc: IgA tiết (IgAs) thường gắn trên niêm mạc đường hô hấp và tiêu hóa. kháng thể này có thể kết hợp đặc hiệu với các kháng nguyên VSV và ngăn cản VSV bám vào niêm mạc hô hấp, tiêu hoá và sinh dục tiết niệu.

- Làm tan vi sinh vật: IgG và IgM khi kết hợp với kháng nguyên (là các VSV) đã hoạt hóa bổ thể dẫn tới làm tan các VK Gram âm, virus và tiêu diệt các VK Gram dương.

- Làm tăng sự thực bào nhờ opsonin hóa: Các IgG và IgM khi đã kết hợp với VSV và sản phẩm của chúng có thể hoạt hóa bổ thể. Phức hợp miễn dịch này làm dễ dàng cho các tế bào thực bào bắt (opsonin hóa) và tiêu hóa các kháng nguyên. Sở dĩ có hiện tượng này là do các tế bào thực bào có các phân tử tiếp nhận với Fc của IgG và C3b của bổ thể.

- Trung hòa độc lực của virus, rickettsia, ngoại độc tố và enzym

- Ngưng kết các vi sinh vật, kết tủa các sản phẩm hòa tan của vi sinh vật

- Độc sát tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC – antibody dependent cytotoxic cell)

4.2.2. Các cơ chế của miễn dịch tế bào trong chống nhiễm trùng

Vai trò của miễn dịch tế bào trong chống nhiễm trùng

Trước khi xem xét cơ chế của miễn dịch tế bào trong chống nhiễm trùng, chúng ta hãy đánh giá khái quát vai trò của miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào trong chống nhiễm VSV.

Kháng thể có vai trò rất quyết định trong chống nhiễm trùng. Với các VSV ký sinh ngoài tế bào, kháng thể, bổ thể và các tế bào thực bào đã có thể hoàn toàn làm mất độc lực của VSV và loại trừ chúng ra khỏi cơ thể. Nhưng với các VSV ký sinh bên trong tế bào (mầm bệnh nội tế bào), kháng thể chỉ có tác dụng ở giai đoạn VSV chưa chui vào tế bào. Khi các VSV đã ở trong tế bào, cơ thể cần có miễn dịch tế bào mới chống lại được chúng. Vì kháng thể không thể chui vào trong tế bào để kết hợp với các VSV.

Các mầm bệnh nội tế bào:

- Các VK: lao, hủi, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, các vi khuẩn ký sinh nội bào bắt buộc

- Tất cả các virus.

- Nấm *Candida albicans*

Cơ chế đặc hiệu của miễn dịch tế bào trong chống nhiễm trùng: Cơ chế này do Lympho T (Ly T) quyết định. Có hai loại Ly T tham gia vào miễn dịch tế bào.

Ly Tc, *TCD8* (LyT độc sát tế bào, cytotoxic cell)

LyTc có khả năng tiêu diệt các tế bào đích, khi nó tiếp xúc trực tiếp các tế bào đích. Các tế bào đích có thể là tế bào ung thư hoặc tế bào bị nhiễm virus, với sự xuất hiện của kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt tế bào đích gắn với MHC1. Các tế bào đích phải có cùng kháng nguyên hòa hợp tổ chức lớp 1 (MHC1) với LyTc nhưng không cần có sự có mặt của kháng thể đặc hiệu. Tế bào đích bị tiêu diệt và các virus chứa bên trong nó.

Quá mẫn muộn (Delayed type hypersensitivity)

Phản ứng quá mẫn muộn để chống lại các mầm bệnh nội tế bào, nhờ tác dụng của các lymphokin do tế bào LyTCD4 sản xuất (MIF, MAF, MCF, IL2, alpha interferon...).

Tóm lại: Cơ thể có bị bệnh nhiễm trùng hay không là phụ thuộc vào sự tương quan giữa VSV gây bệnh và sự đề kháng của cơ thể. Sự đề kháng của cơ thể gồm hai hệ thống đặc hiệu và không đặc hiệu (tự nhiên và thu được). Hai hệ thống này bổ sung, hỗ trợ nhau và không thể tách rời nhau. Nhưng sự đề kháng đặc hiệu đóng vai trò quyết định hơn. Sự đề kháng của cơ thể còn phụ thuộc vào tình trạng sinh lý (chủ yếu là tuổi tác) vào điều kiện sống và làm việc. Một số bệnh tật, nhất là những bệnh làm suy giảm miễn dịch (bệnh của cơ quan miễn dịch và một số bệnh nhiễm trùng) đã làm tăng sự nhiễm trùng.

5. Ứng dụng của miễn dịch trong vi sinh y học

5.1. Vaccin

- Nguyên lý

Vaccin là những kháng nguyên vi sinh vật (có thể là vi sinh vật hoặc sản phẩm của vi sinh vật, hoặc chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật hoặc được tổng hợp hóa học) không còn khả năng gây bệnh, được đưa vào cơ thể để gây miễn dịch chống lại vi sinh vật.

Tuy nhiên không phải mọi kháng nguyên vi sinh vật đều có thể bào chế thành vaccin.

- Tiêu chuẩn của vaccin

Mỗi vaccin đều phải đạt tiêu chuẩn là an toàn và miễn dịch. Tức là vaccin không gây

bệnh và độc hại cho cơ thể, nhưng tạo được miễn dịch đặc hiệu chống lại vi sinh vật gây bệnh.

- Phân loại vaccin

Hiện nay có nhiều loại vaccin đã và đang được sử dụng như:

Vaccin sống là những vi sinh vật còn sống, nhưng không có khả năng gây bệnh. Vaccin này có thể bào chế từ các chủng vi sinh vật gây bệnh nhưng mất độc lực hoặc từ những chủng vi sinh vật không gây bệnh nhưng có miễn dịch chéo với vi sinh vật gây bệnh. Ví dụ vaccin BCG phòng bệnh lao, vaccin sabin phòng bệnh bại liệt...

Vaccin chết được bào chế từ những vi sinh vật gây bệnh nhưng đã làm chết, còn gọi là vaccin bất hoạt. Ví dụ vaccin tả uống...

Vaccin giải độc tố là những vaccin bào chế từ ngoại độc tố của vi khuẩn đã được làm mất độc lực nhưng còn tính kháng nguyên loại vaccin này thường cho thêm các tá chất như hydroxit nhôm gọi là vaccin hấp phụ. Ví dụ vaccin DPT phòng bệnh bạch hầu, uốn ván và ho gà.

Vaccin tinh chế được bào chế từ các sản phẩm của vi sinh vật. Ví dụ vaccin thương hàn được bào chế từ kháng nguyên Vi.

Vaccin công nghệ sinh học được bào chế bằng cách lai ghép gen của vi sinh vật vào vi sinh vật khác để tạo ra các kháng nguyên có tác dụng bảo vệ và an toàn cao. Ví dụ vaccin viêm gan B các thế hệ 2, 3...

- Nguyên tắc sử dụng vaccin

- Đối tượng tiêm chủng

+ Tất cả các cá thể có nguy cơ bị bệnh nhưng chưa có miễn dịch.

+ Trẻ em dưới 5 tuổi là đối tượng đặc biệt quan tâm, vì đây là đối tượng rất dễ bị bệnh nhiễm trùng.

+ Đối với một số bệnh như tả thì đối tượng tiêm chủng có thể là toàn dân, vaccin phòng bệnh uốn ván chỉ tiêm cho những người có nguy cơ bị bệnh này hoặc phụ nữ mang thai.

+ Vaccin phòng bệnh chó dại chỉ tiêm cho người nghi bị chó dại cắn và tất cả chó, mèo nuôi.

- Đối tượng không được tiêm chủng (chống chỉ định)

Tuỳ thuộc từng loại vaccin, nhưng nói chung có một số quy định sau đây:

+ Những người đang bị các bệnh cấp hoặc mạn tính.

+ Vaccin sống giảm độc lực không dùng cho những người bị suy giảm miễn dịch, ung thư, đang dùng thuốc đàn áp miễn dịch (corticoid) hoặc phụ nữ mang thai.

+ Những người bị các bệnh dị ứng.

- Phạm vi và tỷ lệ tiêm chủng

+ Phạm vi hay lãnh thổ tiêm chủng là tùy thuộc vào sự lưu hành của bệnh cần bảo vệ. Ví dụ các vaccin nằm trong chương trình tiêm chủng mở rộng thì tiêm trong toàn quốc, ngược lại một số bệnh lưu hành khu vực (như bệnh tả) thì chỉ tiêm phòng khu vực dịch tả lưu hành hoặc người chuẩn bị tới vùng dịch lưu hành.

+ Tỷ lệ người được tiêm chủng nằm trong phạm vi bảo vệ ngày càng cao càng tốt, ít nhất trên 80%. Nếu dưới tỷ lệ này thì vẫn có khả năng bùng phát dịch, do những cá thể không được gây miễn dịch mắc bệnh và lây lan cho người khác.

- Thời gian tiêm chủng

Tùy theo từng loại vaccin và y tế, nhưng có một số điểm lưu ý sau:

+ Thường tiêm chủng trước mùa dịch khoảng một tháng để tạo miễn dịch bảo vệ chống được dịch. Vaccin tiêm nhiều mũi, khoảng cách giữa các mũi thường là một tháng. Với các vaccin cần tiêm nhắc lại khoảng cách có thể một hoặc vài năm sau.

+ Tổ chức tiêm chủng có thể là từng đợt hoặc liên tục.

- Liều lượng và đường đưa vaccin vào cơ thể

Tùy thuộc vào từng vaccin, có thể có nhiều đường đưa vaccin vào cơ thể như đường tiêm, uống, khí dung...

Ví dụ như:

+ Tiêm trong da với liều 0,1ml như vaccin BCG.

+ Đường uống với liều 1,5ml - 2ml như vaccin tả cho người lớn hoặc hai giọt (như vaccin Sabin trẻ em cho trẻ em).

- Phối hợp vaccin

Phối hợp vaccin nhằm giảm bớt lần tiêm chủng, nhưng không ảnh hưởng tới hiệu lực miễn dịch. Ví dụ có thể kết hợp vaccin với DPT.

- Phản ứng không mong muốn do vaccin

Vaccin phải an toàn với người được tiêm phòng. Nhưng dùng vaccin là đưa một chất lạ vào cơ thể nên có thể xảy ra phản ứng phụ:

+ Tại chỗ tiêm mẩn đỏ, hơi sưng nề. Thường các biểu hiện này mất đi sau một vài ngày.

+ Toàn thân: sốt nhẹ, hơi đau đầu và các dấu hiệu này mất đi sau một vài ngày.

Nếu có các biểu hiện nặng và kéo dài hơn như sốt cao, co giật... cần đến ngay cơ quan y tế để kiểm tra.

- Bảo quản vaccin

Theo quy định của từng loại vaccin. Với các vaccin sống ở dạng đông khô có

thể để nhiệt độ 4- 8oC. Các vaccin sống dạng nước để ở -20oC. Vaccin chết hoặc giải độc tố cần bảo quản 4- 8oC. Vaccin chỉ sử dụng trong thời hạn cho phép.

5.2. *Huyết thanh miễn dịch*

- Nguyên lý

Huyết thanh miễn dịch là kháng thể đặc hiệu chống lại một vi sinh vật nào đó, được đưa vào cơ thể tạo ra bảo vệ tức thì (miễn dịch thụ động nhân tạo).

Huyết thanh miễn dịch có thể được bào chế từ người hoặc động vật.

Huyết thanh được sản xuất từ động vật

Động vật thường dùng để sản xuất huyết thanh là ngựa, nhưng cũng có thể là dê. Đây là những động vật lớn cho nhiều huyết thanh và dễ sản xuất. Chúng được gây miễn dịch với vaccin cần thiết theo một quy trình thích hợp, sau đó huyết thanh của động vật được thu lại. Do huyết thanh miễn dịch của động vật hay gây phản ứng phụ nên hiện nay huyết thanh miễn dịch của người được ưa chuộng hơn.

Huyết thanh được sản xuất từ người

Huyết thanh được sản xuất trên những người tình nguyện, tiêm vaccin gây miễn dịch để thu huyết thanh. Họ được gây miễn dịch theo một quy trình thích hợp với một vaccin nào đấy. Sau đó huyết thanh của họ được thu lại, tinh chế, đóng ống và bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

- Nguyên tắc sử dụng

- *Đối tượng*

Đối tượng dùng huyết thanh miễn dịch là những cá thể bị các bệnh nhiễm độc hoặc nhiễm trùng nặng, như bị các bệnh bạch hầu, uốn ván, hoại thư, dại... Với các bệnh này cần thiết dùng huyết thanh miễn dịch khi rất nghi là bị bệnh. Hiện nay huyết thanh miễn dịch còn dùng chữa rắn cắn kết quả rất tốt.

- *Liều lượng*

Liều lượng huyết thanh miễn dịch phụ thuộc vào cân nặng của cơ thể. Liều thường dùng là 0,1 đến 1ml/kg cân nặng

- *Đường dùng*

Đường đưa huyết thanh vào cơ thể là đường tiêm bắp.

- *Đề phòng tai biến*

Huyết thanh thực chất là một globulin ngoại lai, nên khi đưa vào trong cơ thể nó đóng vai trò một kháng nguyên và gây ra phản ứng phụ nhưng tỷ lệ và mức độ nặng hơn nhiều vaccin.

+Tại chỗ tiêm có thể bị sưng, mẩn đỏ và đau. Thường các biểu hiện này qua trong một vài ngày.

+ Toàn thân: Phản ứng biểu hiện ở nhiều mức độ khác nhau, như nhức đầu, rét run, khó thở, đau các khớp. Nguy hiểm nhất là sốc phản vệ: khó thở, co thắt thanh quản, ngứa toàn thân, nổi mề đay...

Để đề phòng các tai biến trên cần làm các việc sau đây:

+ Khi rất cần thiết mới tiêm huyết thanh lần thứ hai.

+ Cần làm phản ứng thoát mẫn (phản ứng Besredka) trước khi tiêm: Pha loãng huyết thanh ra 10 lần bằng NaCl 0,85%. Tiêm 0,1ml vào trong da. Sau 30 phút nếu nơi tiêm không đỏ thì có thể tiêm cả liều huyết thanh, nếu nơi tiêm có quầng đỏ thì không nên tiêm huyết thanh. Trong trường hợp quá cấp thiết thì chia huyết thanh ra liều nhỏ và tiêm 30 phút một lần. Phải theo dõi cẩn thận.

- *Phối hợp sử dụng vacxin hoặc kháng sinh*

Để tạo được sự bảo vệ lâu dài, sau khi dùng huyết thanh có thể dùng vaccin như trong nhiễm khuẩn bông trực khuẩn mủ xanh.

Để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh song song với dùng huyết thanh nên dùng kháng sinh như với các bệnh bạch hầu hoặc uốn ván.

5.3. Phản ứng kháng nguyên – Kháng thể ứng dụng trong y học

5.3.1. Mục đích các phản ứng kháng nguyên- Kháng thể

- Chẩn đoán các bệnh nhiễm trùng

Chẩn đoán trực tiếp

+ Xác định tên vi sinh vật bằng kháng huyết thanh mẫu (huyết thanh có loại KT đã biết).

+ Phát hiện trực tiếp KN của vi sinh vật có trong bệnh phẩm.

Chẩn đoán gián tiếp

Dùng KN mẫu (đã biết tên) để phát hiện KT đặc hiệu trong các dịch cơ thể, thường là trong huyết thanh (HT), vì vậy còn được gọi là phản ứng HT học.

- Nghiên cứu dịch tễ học của các bệnh nhiễm trùng

Điều tra tình hình nhiễm một loại vi sinh vật nào đó thông qua việc điều tra KT trong HT của mẫu nghiên cứu. Tuy nhiên đây chỉ là một trong nhiều nội dung nghiên cứu dịch tễ học.

- Định loại vi sinh vật

Dùng kháng HT mẫu chống lại các nhóm hoặc các týp vi sinh vật để định nhóm, định týp. Phương pháp này cho phép hiểu biết về cấu trúc KN của vi sinh vật, có thể xếp chúng thành các týp HT.

- Nghiên cứu sự đáp ứng của cơ thể đối với KN vi sinh vật

Một trong những nghiên cứu thuộc loại này là đánh giá hiệu lực đáp ứng miễn dịch của một vaccin. Đây là việc nhất thiết phải làm trước khi thử nghiệm hiệu lực bảo vệ của vaccin.

5.3.2. Các phản ứng kết hợp kháng nguyên- kháng thể

Có rất nhiều phản ứng kết hợp KN-KT được dùng trong vi sinh vật, căn cứ vào cách quan sát nhận định kết quả, có thể xếp thành 3 nhóm.

- Các phản ứng tạo thành hạt

Là các phản ứng mà phức hợp KN-KT hình thành dưới dạng những "hạt" có thể quan sát được bằng mắt thường hoặc nhờ sự trợ giúp của kính lúp.

Phản ứng kết tủa

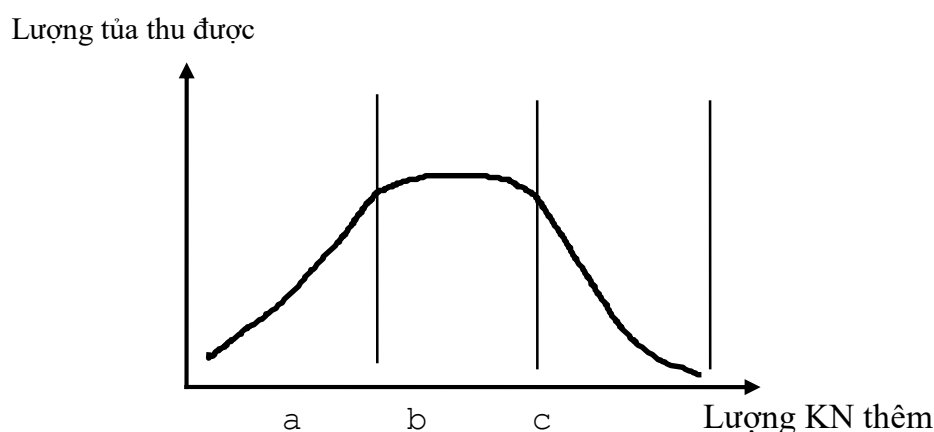
Nguyên lý

Phản ứng kết tủa là sự kết hợp giữa KN hoà tan (KN ở tầm phân tử) với KT tương ứng, tạo thành các hạt có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường hoặc nhờ sự trợ giúp của kính lúp.

Phản ứng kết tủa trong môi trường lỏng

Khi dung dịch KN và dung dịch KT được trộn với nhau theo một tỷ lệ thích hợp, phức hợp KN-KT sẽ hình thành dưới dạng những hạt kết tủa.

Lượng tủa hình thành không chỉ phụ thuộc vào số lượng tuyệt đối của KN và KT, mà còn phụ thuộc vào mối tương quan về lượng giữa KN và KT. Với một lượng kháng HT (KT) hằng định, nếu cho tăng dần lượng KN thì ban đầu lượng tủa tăng dần, nhưng đến một lúc nào đó lượng tủa không tăng nữa mặc dù lượng KN vẫn tiếp tục tăng. Khi KN quá nhiều, lượng tủa hình thành lại tỷ lệ nghịch với lượng KN (Hình 29).



Hình 29. Đường biểu diễn các vùng tương tác giữa KN và KT

a. quá ít KN; b. KN và KT tương đương; c. thừa KN

Phản ứng kết tủa trong gel thạch

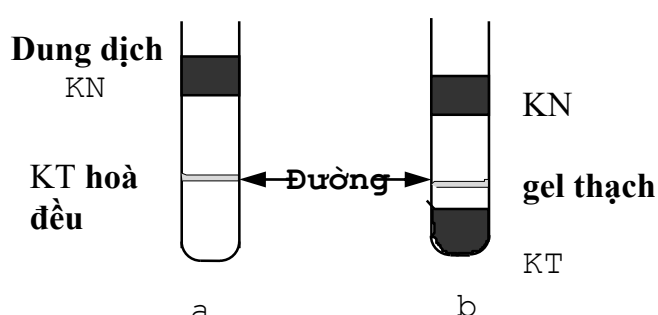
Có nhiều kỹ thuật kết tủa trong gel thạch, dưới đây là một số kỹ thuật thường được sử dụng:

Kỹ thuật khuếch tán trong ống nghiệm (kỹ thuật Oudin):

Kỹ thuật khuếch tán đơn (hình 30a):

Cho thạch đã hoà đều KT vào đoạn dưới ống nghiệm, rồi cho dung dịch KN lên trên. KN sẽ khuếch tán xuống thạch, càng xuống sâu nồng độ KN càng thấp. Tại vùng KN và KT tương đương sẽ xuất hiện đường tủa.

Kỹ thuật khuếch tán kép (hình 30b): Giữa KT và KN có một lớp gel thạch, cả KN và KT đều khuếch tán vào lớp gel thạch này. Tại vùng KN và KT tương đương sẽ xuất hiện đường tủa.



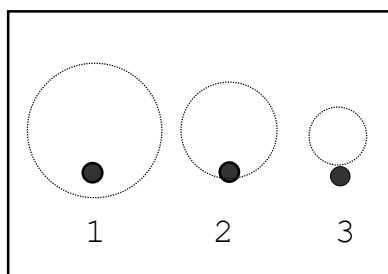
Hình 30. Kỹ thuật khuếch tán trong ống nghiệm:

- a. khuếch tán đơn
- b. khuếch tán kép

Kỹ thuật khuếch tán trên phiến kính hoặc đĩa Petri:

Kỹ thuật khuếch tán đơn (Mancini):

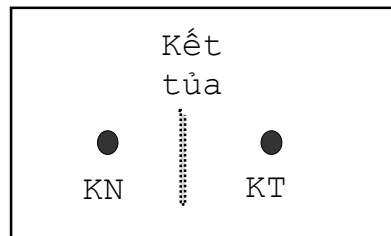
Kháng HT được hoà đều trong gel thạch nóng chảy rồi phủ một lớp mỏng đều lên phiến kính. Sau khi thạch đã đông, tạo các lỗ rồi cho vào các lỗ đó dung dịch của một loại KN nhưng có nồng độ khác nhau. Quanh các lỗ sẽ xuất hiện vòng kết tủa, lỗ nào có nồng độ KN càng cao thì vòng kết tủa càng rộng (Hình 31).



Hình . Kỹ thuật khuếch tán đơn trên phiến kính

1, 2, 3 theo thứ tự là các lỗ chứa dung dịch KN với nồng độ giảm dần, tương ứng là các vòng kết tủa hẹp dần.

Kỹ thuật khuếch tán kép (Ouchterlony): Phủ một lớp mỏng đều gel thạch nóng chảy lên phiến kính. Sau khi thạch đã đông, tạo 2 lỗ; một lỗ cho KN, lỗ còn lại cho KT. KN và KT đều khuếch tán ra xung quanh. Nơi KT và KN gặp nhau với nồng độ tương đương sẽ tạo thành đường kết tủa (Hình 32).



Hình . Kỹ thuật khuếch tán kép trong gel thạch

Phản ứng ngưng kết

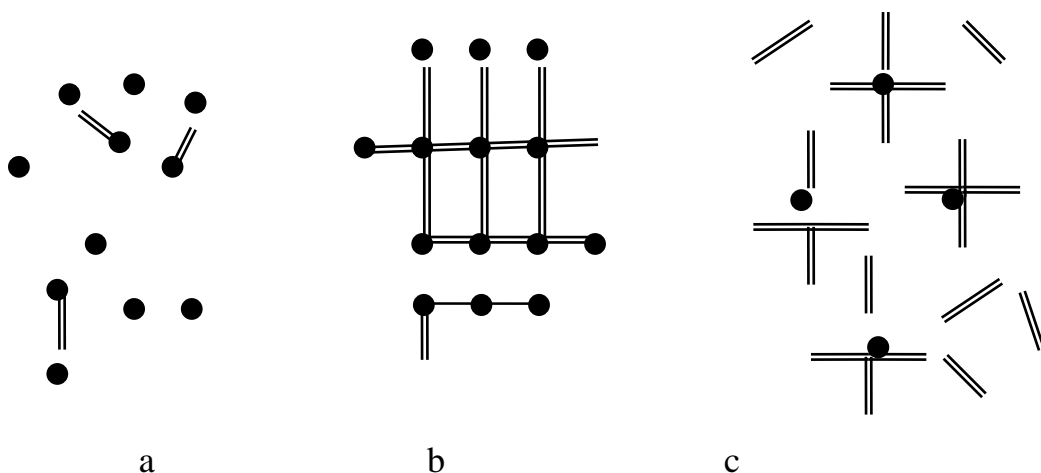
Nguyên lý

Phản ứng ngưng kết là sự kết hợp giữa KN hữu hình (tế bào hoặc tầm tế bào) với KT, tạo thành phức hợp KN-KT dưới dạng những hạt ngưng kết có thể được quan sát bằng mắt thường.

Điều kiện để hình thành hạt ngưng kết

Các hạt ngưng kết thực chất là mạng lưới KN-KT. Để có thể hình thành mạng lưới này, ngoài tính đặc hiệu của KN và KT, phải có thêm hai điều kiện cơ bản:

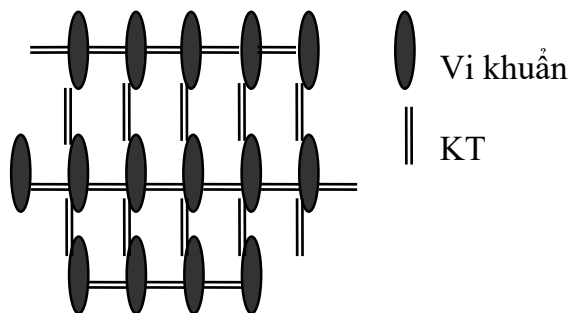
- KN và KT phải đa giá (có nhiều vị trí kết hợp).
- KN và KT phải có nồng độ tương đương.



Hình 33. Mạng lưới ngưng kết chỉ hình thành khi KN (●) và KT (≡) tương đương
 a. KN quá nhiều so với KT; b. KN và KT tương đương; c. KT quá nhiều so với KN.

Phản ứng ngưng kết trực tiếp (ngưng kết chủ động)

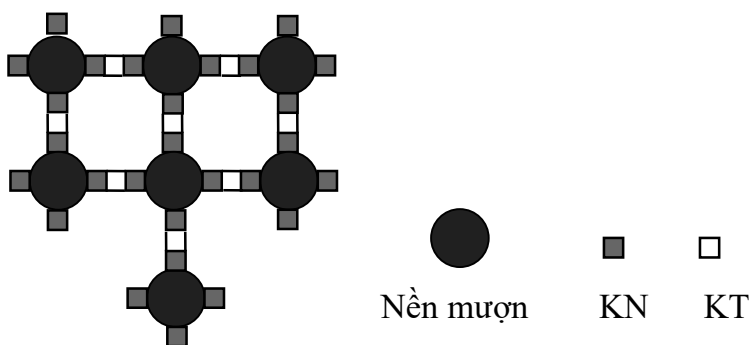
Trong phản ứng ngưng kết trực tiếp, thành phần KN trên tế bào vi khuẩn (hoặc tế bào khác), kết hợp với KT đặc hiệu tạo thành mạng lưới ngưng kết. Các tế bào góp một phần lớn tạo lên kích thước của hạt ngưng kết (Hình 34).



Hình 34. Phản ứng ngưng kết trực tiếp giữa vi khuẩn và KT đặc hiệu

Phản ứng ngưng kết gián tiếp (ngưng kết thụ động)

Trong phản ứng ngưng kết gián tiếp, KN ở dạng hoà tan được gắn lên nền mựn hữu hình (thường là hồng cầu hoặc hạt latex). Khi KN gặp KT đặc hiệu, hiện tượng ngưng kết sẽ xảy ra do nền mựn tụ tập lại một cách "thụ động" (Hình 35).



Hình 35. Phản ứng ngưng kết gián tiếp

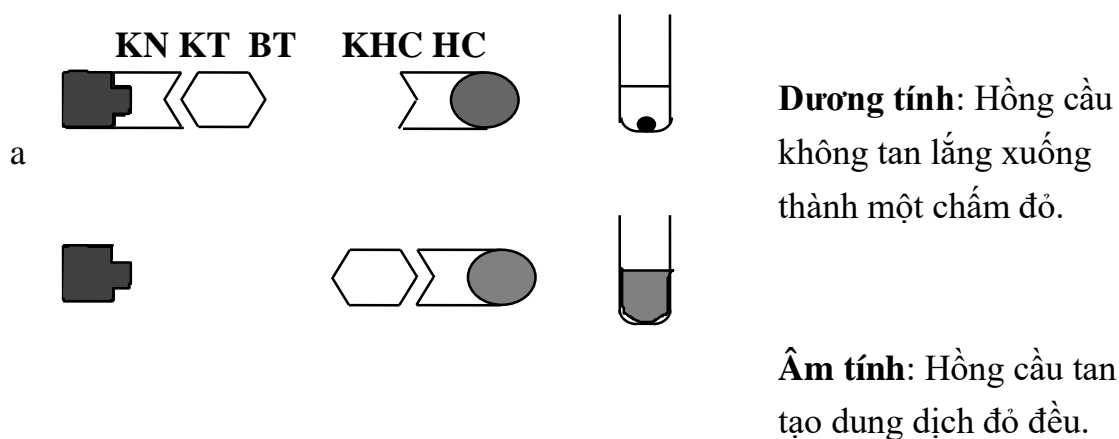
Để phát hiện KN, người ta lại gắn KT lên nền mựn. Khi KT gặp KN đặc hiệu, hiện tượng ngưng kết cũng sẽ xuất hiện. Loại này được gọi là phản ứng "ngưng kết thụ động ngược". Có một phản ứng cũng theo nguyên lý ngưng kết thụ động ngược có tên là "đồng ngưng kết protein A". Phản ứng này dựa trên hiểu biết rằng,

KT đặc hiệu với sự tham gia của bộ thể sẽ gây ly giải tế bào. Trong các phản ứng gây ly giải tế bào, phản ứng kết hợp bộ thể được sử dụng nhiều hơn cả.

Các bước tiến hành phản ứng kết hợp bộ thể

- 1) Cho KN, HT cần xét nghiệm và bộ thể, ủ ở 37°C/30 phút hoặc 60°C/16 giờ.
- 2) Cho thêm hồng cầu cừ đã trộn với KT tương ứng, để ở 37°C trong 15 - 30 phút.

Đọc kết quả: Nếu hồng cầu cừ không tan là dương tính. Nếu hồng cầu bị tan là âm tính (Hình 37).



b **KT(-)**

Hình 37. Phản ứng kết hợp bộ thể

a. trong HT có KT, b. trong HT không có KT

- Các phản ứng dùng KT hoặc KN đánh dấu

Nguyên lý chung: KN hoặc KT được xác định nhờ chất đánh dấu được gắn với KT hoặc KN.

Điều kiện cần thiết là chất đánh dấu không được làm thay đổi hoạt tính miễn dịch của KN và KT.

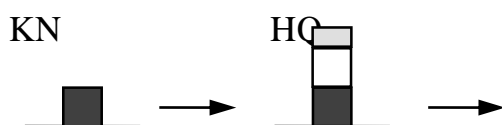
Miễn dịch huỳnh quang (MDHQ)

Trong MDHQ, chất đánh dấu là chất màu huỳnh quang, kết quả được đọc nhờ kính hiển vi huỳnh quang.

MDHQ trực tiếp

Nguyên lý: KN được phát hiện nhờ KT mẫu gắn huỳnh quang.

Các bước tiến hành như sau (Hình 38):

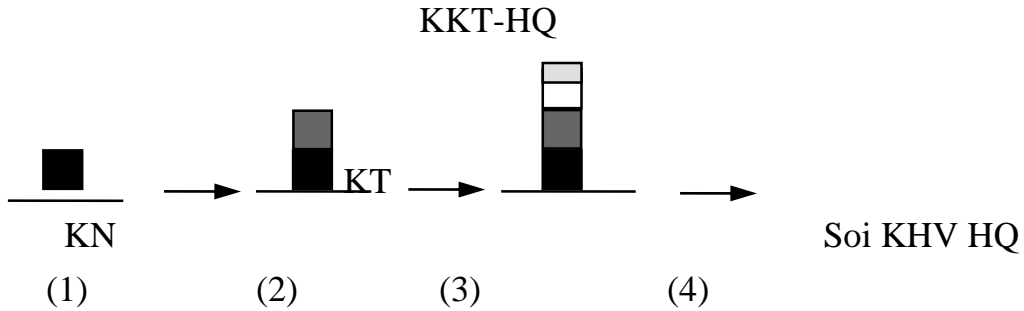


(1) (2) (3)

Hình 38. Phương pháp MDHQ trực tiếp

Phương pháp MDHQ gián tiếp

Nguyên lý: KT được phát hiện nhờ KN mẫu và kháng KT (KKT) mẫu gắn huỳnh quang. Các bước tiến hành như sau (Hình 39):



Hình 39. Phương pháp MDHQ gián tiếp

Phản ứng miễn dịch phóng xạ (RIA-Radioimmunoassay)

Nguyên lý: Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ KT hoặc KN gắn chất đồng vị phát xạ. Có thể phát hiện nơi phát xạ (nơi xảy ra phản ứng kết hợp KN-KT) hoặc đo cường độ phát xạ (mức độ hình thành phức hợp KN-KT).

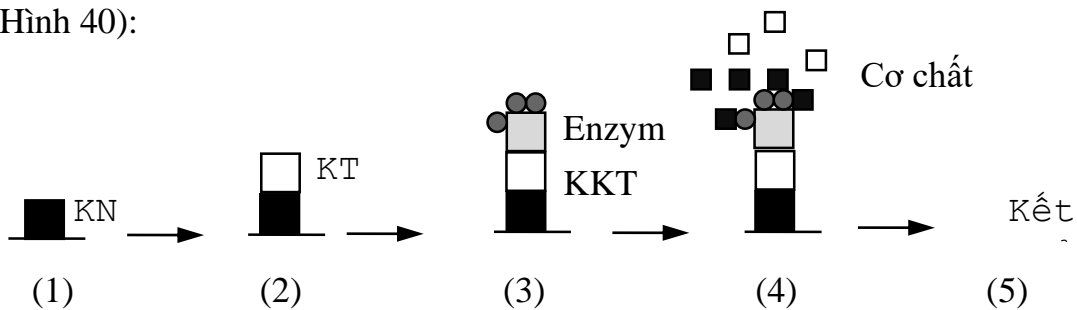
Phản ứng miễn dịch enzym ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Nguyên lý: Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu.

Có nhiều kỹ thuật ELISA. Sau đây chỉ giới thiệu 2 kỹ thuật, một để phát hiện KT và một để phát hiện KN:

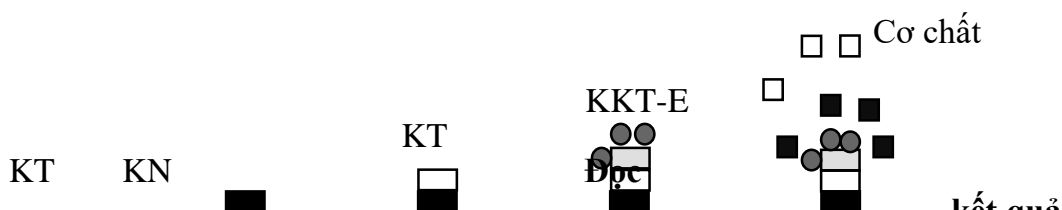
Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KT

Phản ứng này sử dụng KN mẫu và KKT mẫu gắn enzym. Các bước tiến hành (Hình 40):



Hình 40. ELISA: Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KT

Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KN

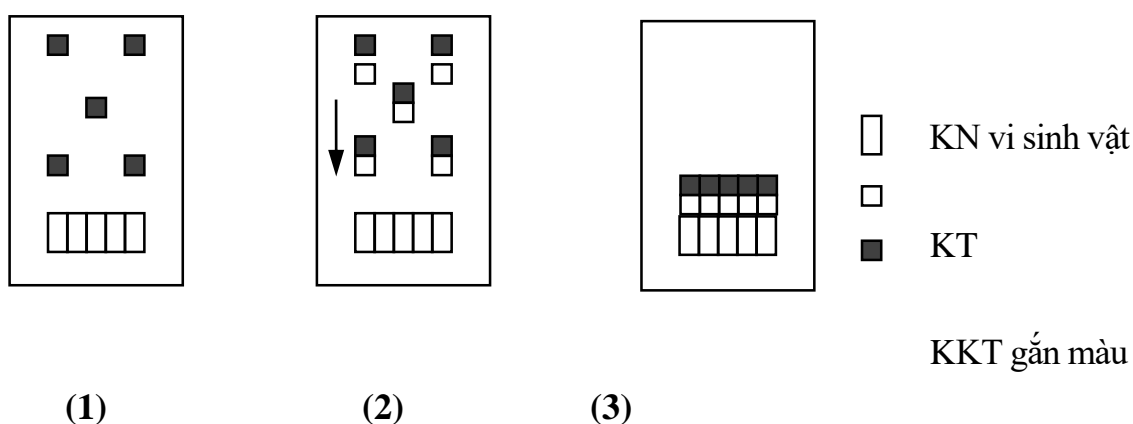


Phản ứng này sử dụng KT mẫu và KKT mẫu gắn enzym. Các bước tiến hành (Hình 41):

Hình 41. ELISA: Kỹ thuật dùng KKT gắn enzym để phát hiện KN

Sắc ký miễn dịch

Nguyên tắc kỹ thuật có thể tóm tắt như sau:



Hình 42. Sơ đồ minh họa nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch

1. Bản sắc ký với KN được cố định và KKT gắn màu phân bố đều; 2. KT trong HT kết hợp với KKT gắn màu và di chuyển; 3. Phức hợp KT-KKT gắn màu kết hợp với KN tạo vạch màu

Phức hợp kháng KT (KKT) gắn chất màu được phân bố đều trên bản sắc ký. KN đặc thù của vi sinh vật được gắn cố định tại “vạch phản ứng”. Khi nhỏ HT cần xác định KT lên bản sắc ký, KT đặc hiệu (nếu có) trong HT sẽ kết hợp với KKT gắn màu, phức hợp KT-KKT gắn màu này di chuyển trên giấy sắc ký sẽ bị giữ lại tại “vạch phản ứng” do KT kết hợp với KN vi sinh vật, kết quả “vạch phản ứng” hiện màu. Nếu trong HT không có KT đặc hiệu, ở “vạch phản ứng” KN không thể giữ được KKT gắn màu, vì vậy không hiện màu (Hình 47).

5.3.3. Nhận định kết quả

Bất kỳ phản ứng kết KN-KT nào cũng nhằm mục đích xác định KT hoặc KN, có thể là định tính hoặc định lượng.

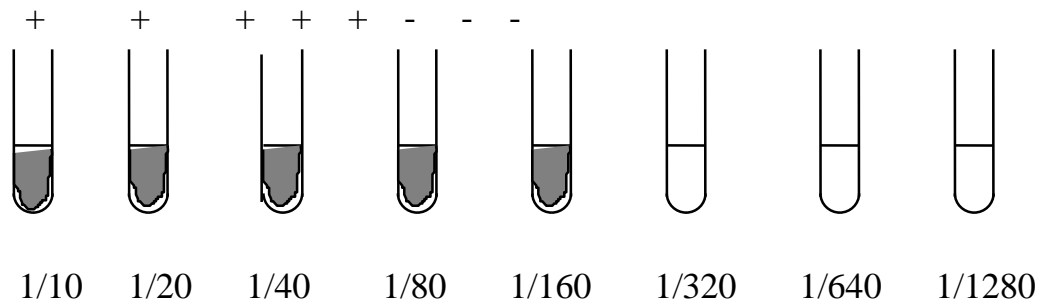
5.3.3.1. Định tính

Kết quả định tính chỉ cho biết trong mẫu xét nghiệm có hay không có KT hoặc KN. Có những trường hợp chỉ cần định tính đã có giá trị chẩn đoán. Đó là các trường hợp xác định những KN hoặc KT mà bình thường không có trong những mẫu xét nghiệm lấy từ người khoẻ mạnh. Ngược lại đối với những loại KN hoặc KT có thể tìm thấy cả ở người bình thường thì chỉ định lượng mới có giá trị chẩn đoán.

5.3.3.2. Định lượng

Trong mục này chỉ trình bày việc nhận định kết quả định lượng trong chẩn đoán HT (phương pháp chẩn đoán gián tiếp các bệnh nhiễm trùng qua việc xác định KT trong HT).

Hiệu giá KT: Hiệu giá KT phản ánh nồng độ KT trong HT. Hiệu giá KT là độ pha loãng HT lớn nhất mà phản ứng còn dương tính (Hình 43). Trong một số trường hợp, hiệu giá KT còn được tính bằng đơn vị KT có trong một đơn vị thể tích HT.



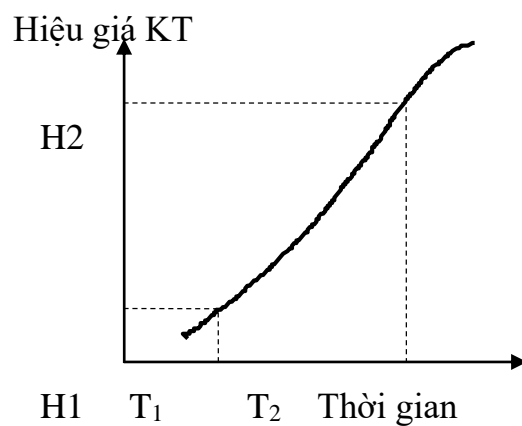
Hình 43. Hiệu giá KT bằng 160

Sau khi xác định hiệu giá KT, việc đánh giá kết quả phải dựa vào hiệu giá ranh giới (ngưỡng) giữa bình thường và bệnh lý, vì người khoẻ bình thường vẫn có thể có KT chống lại một số vi sinh vật. Tuy nhiên không phải cứ có hiệu giá KT cao hơn ngưỡng là bệnh lý, và ngược lại cứ thấp hơn là người lành. Hiệu giá KT càng cao hơn ngưỡng thì khả năng mắc bệnh càng lớn, càng thấp hơn ngưỡng thì khả năng mắc bệnh càng ít. Việc xác định hiệu giá KT ở một thời điểm thường chưa đủ để có kết luận chắc chắn, cần phải tiến hành 2 lần ở 2 thời điểm cách nhau từ 7 đến 10 ngày để tìm động lực KT.

Động lực KT là đại lượng đặc trưng cho mức độ thay đổi hiệu giá KT theo thời gian (Hình 44).

Động lực KT là thương số (không phải là hiệu số) giữa hiệu giá KT lần thứ hai và lần thứ nhất. Khi KT đang tăng thì động lực lớn hơn 1. Khi KT không thay đổi thì động lực bằng 1. Khi KT đang giảm thì động lực nhỏ hơn 1. Mặc dù về lý thuyết khi động lực KT lớn hơn 1 là đang có KN kích thích cơ thể hình thành KT, nhưng trên thực tế động lực KT ít nhất phải bằng 4 (tức là tăng 2 bậc khi HT được

pha loãng bậc 2) mới có giá trị chẩn đoán chắc chắn là bệnh nhân đang mắc bệnh nhiễm trùng. Khi xét nghiệm lần thứ hai nếu hiệu giá KT chỉ tăng hơn lần thứ nhất 1 bậc thì chưa chắc đã phải là KT tăng thực sự hay chỉ do sai số kỹ thuật.



Hình 44. Động lực KT = H2: H1

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 3. KHÁNG SINH VỚI VI KHUẨN VÀ SỰ KHÁNG KHÁNG SINH

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày được định nghĩa, phân loại và cơ chế tác dụng của thuốc kháng sinh.
- Trình bày được nguồn gốc sự đề kháng kháng sinh, khả năng lan truyền và các biện pháp ngăn ngừa sự gia tăng của vi khuẩn đề kháng.
- Kể tên các yếu tố làm tăng nguy cơ vi khuẩn kháng kháng sinh.
- Trình bày các biện pháp ngăn ngừa sự gia tăng của vi khuẩn đề kháng.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

Năm 1928, *Fleming* phát hiện nấm penicillium diệt *Staphylococcus aureus* ở bệnh viện *Saint Marie*. Năm 1940, nhóm nghiên cứu ở Oxford (*Flory, Chain* và *Hartley*) đã tinh chế được penicillin và mở ra kỷ nguyên dùng kháng sinh để điều trị bệnh nhiễm trùng. Streptomycin được *Waksman* tìm ra năm 1944; 1947 *Ehrlich* tìm ra chloramphenicol và năm 1948, *Duggar* tìm thấy chlortetracyclin. Đến nay có trên 2000 chất kháng sinh đã được xác định, song chỉ một số ít (khoảng 50) trong đó được dùng để điều trị bệnh ở người.

Kháng sinh, thoạt đầu là do các tế bào sống, phần nhiều là vi sinh vật, đặc biệt là nấm *Streptomyces* tiết ra nên kháng sinh (antibioticum) được coi là yếu tố sinh học ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn.

Đến nay kháng sinh còn là những dẫn xuất thu được sau những biến đổi hoá học (gọi là kháng sinh bán tổng hợp) hay bằng đường sinh tổng hợp trong phòng thí nghiệm (ví dụ sulfamid). Vì vậy, định nghĩa về chất kháng sinh đã được mở rộng, không phải duy nhất chỉ do vi sinh vật sinh ra.

Một số kháng sinh ức chế đặc hiệu của quá trình trao đổi chất của vi khuẩn, do đó dùng để chữa các bệnh nhiễm khuẩn như penicillin, streptomycin... Một số kháng sinh ức chế quá trình trao đổi chất của cả Prokaryota (tế bào tiền nhân) và Eucaryota (tế bào nhân thật) như mitomycin C, thì dùng để nghiên cứu thực nghiệm và một số có thể dùng cho điều trị ung thư (actinomycin D).

Chất kháng vi sinh vật (antimicrobial agents) là khái niệm để chỉ những chất

có tác dụng chống lại sự phát triển của vi sinh vật nói chung, nó bao gồm kháng sinh chống vi khuẩn (antibacterial), chống nấm (antifungi) và chống virus (antiviral). Trong bài này chỉ giới thiệu về kháng sinh chống vi khuẩn.

1. Định nghĩa

Kháng sinh (antibiotica, chemotherapeutica) là những chất ngay ở nồng độ thấp đã có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật một cách đặc hiệu, bằng cách gây rối loạn phản ứng sinh học ở tầm phân tử. (Nồng độ thấp: Nồng độ sử dụng để điều trị nhỏ hơn nhiều lần so với liều độc đối với cơ thể người; đặc hiệu: Mỗi kháng sinh chỉ có tác dụng trên một loại vi khuẩn hay một nhóm vi khuẩn).

2. Phân loại

Có nhiều kiểu xếp loại kháng sinh, theo tính chất hoá học hoặc theo nguồn gốc hay theo phổ tác dụng ... Đối với vi sinh y học thì cách sắp xếp theo phổ tác dụng - khả năng chống vi khuẩn, có giá trị thực tế hơn.

2.1. Thuốc kháng sinh có hoạt phổ rộng

Hoạt phổ rộng nghĩa là một kháng sinh có thể tác dụng trên nhiều loại vi khuẩn (cả Gram dương và Gram âm), bao gồm:

- + Nhóm aminoglycosid (aminozid): Streptomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin ...
- + Nhóm tetracyclin: Tetracyclin, doxycyclin ...
- + Nhóm chloramphenicol
- + Nhóm sulfamid và trimethoprim

2.2. Thuốc kháng sinh có hoạt phổ chọn lọc

Hoạt phổ chọn lọc nghĩa là một kháng sinh chỉ có tác dụng trên một hoặc một số loại vi khuẩn nhất định.

- + Các dẫn xuất của acid isonicotinic, như INH chỉ dùng chữa lao
- + Nhóm macrolid như erythromycin, spiramycin ... có tác dụng lên vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm
- + Nhóm polymycin chỉ có tác dụng lên trực khuẩn Gram âm

2.3. Cơ chế tác động của thuốc kháng sinh

2.3.1. Ức chế sinh tổng hợp vách

Kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp bộ khung peptidoglycan (murein) làm cho vi khuẩn sinh ra sẽ không có vách và do đó dễ bị tiêu diệt, ví dụ kháng sinh nhóm beta-lactam, vancomycin

2.3.2. Gây rối loạn chức năng màng nguyên tương

Chức năng quan trọng nhất của màng nguyên tương đối với tế bào là thẩm thấu

chọn lọc; khi kháng sinh tác động vào màng nguyên tương sẽ làm cho các thành phần trong nguyên tương của vi khuẩn bị thoát ra ngoài và nước từ bên ngoài ào ạt vào trong dẫn đến chết, ví dụ polymycin, colistin

2.3.3. Ức chế sinh tổng hợp protein

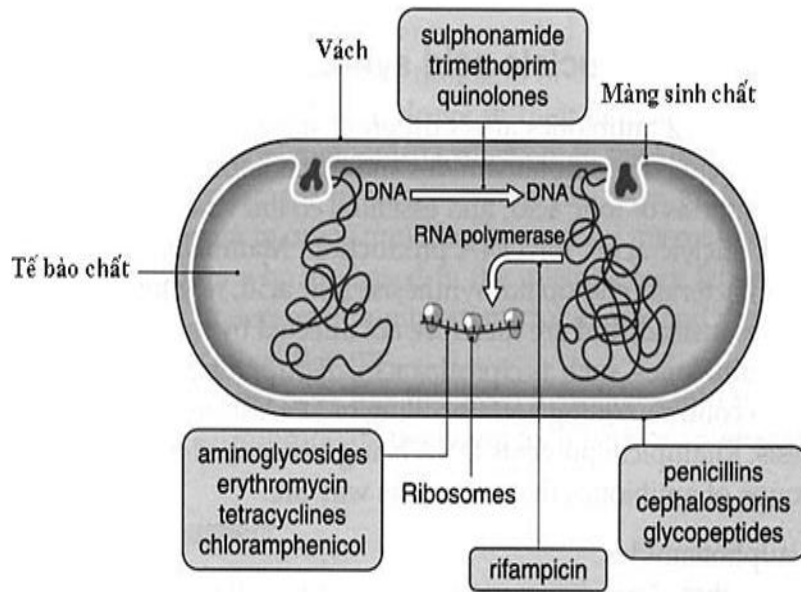
Nơi tác động là ribosom 70S trên polyxom của vi khuẩn. Kháng sinh gắn vào tiểu phần 30S (như streptomycin) sẽ ngăn cản hoạt động của ARN thông tin hoặc ức chế chức năng của ARN vận chuyển (như tetracyclin). Kháng sinh gắn vào tiểu phần 50S như erythromycin, chloramphenicol, làm cản trở sự liên kết, hình thành các chuỗi acid amin tạo phân tử protein cần thiết cho tế bào sống.

2.3.4. Ức chế sinh tổng hợp acid nucleic

Kháng sinh có thể ngăn cản sự sao chép của ADN mẹ tạo ADN con như nhóm quinolone hoặc gắn ARN-polimerase ngăn cản sinh tổng hợp ARN như rifampicin hoặc bằng cách ức chế sinh tổng hợp các chất chuyển hoá cần thiết để ngăn cản hình thành nên các nucleotid như sulfamid và trimethoprim.

Như vậy, mỗi kháng sinh chỉ tác động lên một điểm nhất định trong thành phần cấu tạo, ảnh hưởng đến một khâu nhất định trong các phản ứng sinh học khác nhau của tế bào vi khuẩn, dẫn đến ngừng trệ sự sinh trưởng và phát triển của tế bào. Nếu vi khuẩn không bị ly giải hoặc bị nắm bắt (thực bào) tiêu diệt thì, khi không còn tác động của kháng sinh (ngừng thuốc) vi khuẩn sẽ có thể hồi phục trở lại.

Kháng sinh có tác dụng giết chết vi khuẩn gọi là diệt khuẩn (bactericid) ví dụ nhóm beta-lactam, polymyxin, ... ; kháng sinh chỉ ức chế vi khuẩn gọi là chế khuẩn (bacteriostatic) ví dụ chloramphenicol, tetracyclin, ... Trong thực tế, thuốc có tác dụng diệt khuẩn nhưng ở nồng độ thấp thì chỉ có tác dụng chế khuẩn và ngược lại, thuốc có tác dụng chế khuẩn nhưng ở nồng độ cao lại có tác dụng diệt khuẩn. Nhưng cao là bao nhiêu thì kháng sinh phát huy tác dụng và cơ thể con người còn chịu đựng được (liều độc) thì tùy theo từng loại thuốc (khả năng khuếch tán đến ổ nhiễm khuẩn - các thông số động dược học) và cơ địa từng người bệnh cụ thể. Vì vậy, việc sử dụng kháng sinh phải được bác sỹ kê đơn và theo dõi cẩn thận.



Hình 5.1. Sơ đồ vị trí tác động của kháng sinh trên tế bào vi khuẩn

2.4. Sự đề kháng kháng sinh

Với cơ chế tác dụng như trên, kháng sinh ức chế được sự phát triển của vi khuẩn, nhưng một khi trong môi trường có kháng sinh mà vi khuẩn vẫn phát triển thì được coi là sự đề kháng kháng sinh.

Trước hết cần phân biệt đề kháng thật với đề kháng giả.

2.4.1. Đề kháng giả

Đề kháng giả nghĩa là chỉ có biểu hiện bên ngoài (phenotyp) mà bản chất không phải là sự đề kháng, tức là không do nguồn gốc di truyền quyết định.

Ví dụ biểu hiện đề kháng của vi khuẩn:

Khi nằm trong các ổ áp xe nung mủ lớn hoặc có tổ chức hoại tử bao bọc; người bệnh có dùng kháng sinh nhưng, do kháng sinh bị các tổ chức viêm, tế bào hoại tử ... ngăn cản, không thấm tới được ổ viêm và tới vi khuẩn gây bệnh nên không phát huy được tác dụng. Hoặc khi vi khuẩn ở trạng thái nghỉ (không có chuyển hoá và nhân lên) thì không chịu tác dụng của những thuốc ức chế quá trình sinh tổng hợp chất, ví dụ khi vi khuẩn lao nằm trong hang lao.

Vì thế, trong trường hợp này, nếu giải phóng các tổ chức viêm hay tế bào hoại tử (ví dụ bằng tiểu phẫu), kháng sinh thấm tới được ổ vi khuẩn thì sẽ phát huy tác dụng. Hoặc khi vi khuẩn lao trở lại trạng thái hoạt động (có chuyển hoá, sinh sản) thì lại chịu tác dụng của kháng sinh.

2.4.2. Đề kháng thật

Bao gồm:

+ *Đề kháng tự nhiên*

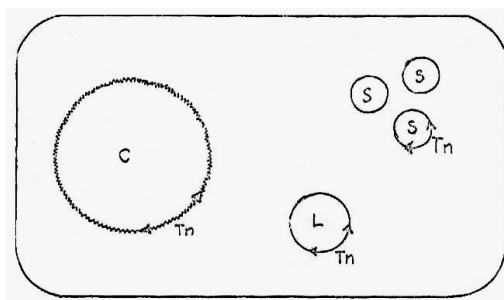
Một số vi khuẩn không chịu tác động của một số kháng sinh nhất định, ví dụ tụ cầu không chịu tác dụng của colistin hoặc *Pseudomonas* không chịu tác dụng của penicillin.

Các vi khuẩn không có vách như *Mycoplasma* sẽ không chịu tác dụng của kháng sinh ức chế sinh tổng hợp vách như beta-lactam.

+ *Đề kháng thu được*

Do một biến cố di truyền là đột biến hoặc nhận được gen đề kháng mà vi khuẩn đang từ không trở nên có gen đề kháng.

Các gen đề kháng có thể nằm trên những thành phần khác nhau mang chất liệu di truyền trong tế bào vi khuẩn, đó là nhiễm sắc thể hay plasmid hoặc trên transposon.



Hình 5.2. Sơ đồ tế bào vi khuẩn với các thành phần mang gen đề kháng

C= nhiễm sắc thể; L= plasmid lớn; S= plasmid nhỏ; Tn= transposon

Plasmid là phân tử ADN dạng vòng tròn nằm trong nguyên tương, ngoài nhiễm sắc thể và có khả năng tự nhân lên; do vậy, nó cũng được truyền sang thế hệ sau khi vi khuẩn phân chia.

Những plasmid mang gen đề kháng gọi là R-plasmid (R = Resistance = đề kháng). Plasmid có thể to (trọng lượng phân tử lớn) hay nhỏ (trọng lượng phân tử nhỏ) nhưng đều bé hơn độ lớn của nhiễm sắc thể.

Plasmid lớn nếu có mang bộ gen đặc biệt (tra^+) sẽ giúp cho tế bào mang nó tiếp xúc trực tiếp được với tế bào khác và truyền R-plasmid. Những plasmid này thường mang nhiều gen đề kháng nên hay được truyền "cả cụm"; hậu quả là vi khuẩn nhận có thể đang từ nhạy cảm hoàn toàn với kháng sinh trở nên kháng đa kháng sinh, ngay sau khi nhận được R-plasmid. Hiện tượng này đã được phát hiện ở nhiều vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae. Thậm chí, R-plasmid có thể truyền được từ loài vi khuẩn này sang loài vi khuẩn khác, ví dụ từ vi khuẩn ly sang *E.coli*, từ *E.coli* sang vi khuẩn thương hàn Đây là điều rất đáng lo ngại, vì nó sẽ làm gia tăng nhanh chóng vi khuẩn kháng đa kháng sinh.

Transposon (ký hiệu là Tn) là những đoạn ADN có cấu tạo đặc biệt nên có thể

"nhảy" (chuyển vị trí) được từ một phân tử ADN này sang một phân tử ADN khác ngay trong một tế bào vi khuẩn. Đây là yếu tố nguy hiểm vì nó giúp cho gen đề kháng có thể lan truyền rộng rãi một cách dễ dàng hơn.

Các gen đề kháng có thể lan truyền được từ vi khuẩn nọ sang vi khuẩn kia thông qua các hình thức vận chuyển di truyền khác nhau như biến nạp (khi vi khuẩn đề kháng bị ly giải), tải nạp (nhờ phage), tiếp hợp (khi vi khuẩn đề kháng tiếp xúc với vi khuẩn nhạy cảm) hoặc chuyển vị trí ("nhảy" nhờ transposon).

Điều đáng quan tâm là vai trò chọn lọc của kháng sinh: Khi kháng sinh được dùng rộng rãi và nhất là không đủ liều lượng thì chính kháng sinh lại là yếu tố chọn lọc, loại trừ (tiêu diệt) các vi khuẩn nhạy cảm và giữ lại những vi khuẩn đề kháng kháng sinh. Những cá thể (tế bào) đề kháng sẽ phát triển thành những dòng vi khuẩn đề kháng trong quần thể vi sinh vật.

Khi kháng sinh được dùng rộng rãi và nhất là không đủ liều lượng thì chính kháng sinh cũng lại là yếu tố kích thích vi khuẩn, gây ra những thay đổi (đột biến cảm ứng) để thích ứng với môi trường.

Phối hợp giữa sự xuất hiện cùng nhiều khả năng lan truyền gen đề kháng và chọn lọc vi khuẩn đề kháng như đã nêu ở trên, số lượng và mức độ vi khuẩn kháng kháng sinh trong cộng đồng ngày càng gia tăng.

2.4.3. Cơ chế lan truyền gen đề kháng và vi khuẩn đề kháng

Một vi khuẩn có gen đề kháng, gen đó sẽ được truyền dọc (vertical) qua các thế hệ trong quá trình nhân lên (phân chia) của tế bào (ví dụ đời ông sang cha, cha sang đời con, con sang đời cháu ...); ngoài ra, thông qua các hình thức vận chuyển di truyền, gen đề kháng có thể được truyền ngang (horizontal) từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.

Xét về mặt dịch tễ học, gen đề kháng có thể được lan truyền trên bốn phương diện khác nhau, đó là:

+ Trong tế bào (intracellular)

Thông qua biến có tái tổ hợp hoặc chuyển vị trí của transposon gen đề kháng có thể truyền từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác ngay trong một tế bào.

+ Giữa các tế bào (intercellular)

Thông qua các hình thức vận chuyển di truyền như tiếp hợp, biến nạp, tải nạp, dẫn truyền mà gen đề kháng có thể được truyền từ tế bào này sang tế bào kia, thậm chí giữa hai vi khuẩn khác loài.

Những biến cố này rất hiếm xảy ra; nhưng một khi đã xảy ra thì hết sức nguy hiểm vì sự phát triển nhanh chóng của vi khuẩn.

+ Trong quần thể vi sinh vật (microbiotop)

Thông qua sự chọn lọc dưới tác dụng của kháng sinh, các dòng vi khuẩn đề kháng được giữ lại, phát triển và thay thế các dòng vi khuẩn nhạy cảm đã bị kháng sinh tiêu diệt.

+ Trong quần thể đại sinh vật (macrobiotop)

Thông qua sự truyền nhiễm (qua không khí, bụi, thức ăn, nước, dụng cụ, ...) vi khuẩn đề kháng truyền từ người này sang người khác hoặc từ súc vật sang người.

Trong cuộc chạy đua giữa những nỗ lực phát minh ra kháng sinh mới của con người và sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn thì cho đến nay vi khuẩn vẫn luôn giành phần thắng. Vì vậy, để giữ gìn sức mạnh của kháng sinh và ngăn ngừa sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn, chúng ta phải thực hiện chiến lược sử dụng kháng sinh an toàn, hợp lý.

2.4.4. Biện pháp hạn chế gia tăng vi khuẩn kháng kháng sinh

+ Chỉ dùng kháng sinh để điều trị những bệnh nhiễm khuẩn (những kháng sinh nêu trong bài này không có tác dụng trên virus) .

+ Chọn kháng sinh theo kết quả kháng sinh đồ; nên ưu tiên kháng sinh có hoạt phổ hẹp, tác dụng đặc hiệu trên vi khuẩn gây bệnh và khuếch tán tốt nhất đến ổ vi khuẩn.

+ Dùng kháng sinh đủ liều lượng và thời gian (cho một đợt điều trị).

+ Đề cao các biện pháp khử trùng và tiệt trùng, ngăn ngừa sự lan truyền vi khuẩn đề kháng.

+ Liên tục giám sát sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn để có chiến lược sử dụng kháng sinh hợp lý.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 4. VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN, VI HỆ BÌNH THƯỜNG

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày được đặc điểm của vi sinh vật trong tự nhiên..
- Mô tả được hệ vi khuẩn bình thường cơ thể người và vai trò của chúng trong y học.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập..

NỘI DUNG

Thế giới sinh vật bao gồm động vật, thực vật và vi sinh vật. Vi sinh vật là những sinh vật nhỏ bé mà mắt thường không thể nhìn thấy được. Thế nhưng, vi sinh vật lại đóng một vai trò quan trọng trong hệ sinh thái, vì thiếu nó thế giới sinh vật sẽ không thể tồn tại được. Hãy tưởng tượng, mặt đất sẽ chặt kín và chùng chát xác các cây to, cây nhỏ, xác động vật hoang dã, xác gia súc nhà nuôi và cả xác con người nếu không có vi sinh vật phân huỷ. Như vậy, vi sinh vật tham gia vào chu trình tuần hoàn cacbon, nitơ, phospho, lưu huỳnh và khoáng hoá. Vi khuẩn và nấm trong đất thực hiện các quá trình phân huỷ chất hữu cơ, tái tạo cacbonic, cung cấp nguồn thức ăn và khoáng chất cho cây xanh.

Đối với đời sống con người, rất nhiều vi sinh vật có lợi đã được tận dụng như các loài nấm lên enzym để sản xuất bia, rượu; nhiều loài vi nấm sản xuất kháng sinh; vi khuẩn sản sinh acid glutamic (mỳ chính)... . Đặc biệt là vai trò độc quyền của vi sinh vật trong việc phân huỷ cellulose và dầu hoả, khí đốt.

Tuy thế, cũng lại có những vi sinh vật có hại cho con người, đặc biệt là có hại cho sức khoẻ, đó là những vi sinh vật có khả năng gây bệnh.

Vì vậy, Vi sinh vật y học có nhiệm vụ là: Nghiên cứu sự tồn tại và phát triển của những vi sinh vật này trong môi trường tự nhiên, trong cơ thể người và cách mà chúng xâm nhập vào cơ thể, để tìm ra biện pháp phòng chống bệnh thích hợp.

1. Vi sinh vật trong môi trường

1.1. Vi sinh vật trong đất

Đất là nơi chứa nhiều vi sinh vật nhất. Tùy theo tính chất của từng loại đất (đất cát, đất thó, đất mùn ...), nhiệt độ, độ ẩm mà số lượng vi sinh vật trong đất khác nhau. Trong đất có rất nhiều vi khuẩn và nấm tham gia vào chu trình khoáng hoá chất hữu

cơ và cân bằng sinh thái. Đây là loại thứ nhất: Những vi sinh vật gây thối rữa và không gây bệnh. Loại thứ hai là những vi sinh vật gây bệnh từ chất bài tiết (ví dụ phân) hoặc từ xác động vật, người bị bệnh.

Những vi khuẩn có khả năng hình thành nha bào như trực khuẩn than, uốn ván, hoại thư sinh hơi, ngộ độc thịt ... sẽ tồn tại được rất lâu trong đất, có thể vài chục năm. Khi có điều kiện xâm nhập được vào cơ thể (ví dụ qua vết thương, tai nạn) chúng sẽ có thể gây thành bệnh.

Vùng đất bị nhiễm phân động vật và người sẽ có rất nhiều vi sinh vật thuộc hệ vi khuẩn đường ruột như các trực khuẩn họ Enterobacteriaceae, trực khuẩn Gram-dương, các Clostridia, ...

Vì vậy, việc tìm hiểu vi sinh vật trong đất là một trong những nội dung nghiên cứu về sự ô nhiễm của môi trường.

1.2. Vi sinh vật trong nước

Nước là môi trường tốt cho nhiều vi sinh vật phát triển.

Nước sông, ao, hồ, giếng có thể nhiễm vi sinh vật gây bệnh do nhiễm phân, chất thải, nước tiểu hoặc xác động vật. Có thể vi sinh vật từ đất (mạch nước ngầm) thấm ra hoặc từ không khí rơi xuống làm ô nhiễm nguồn nước.

Một số vi khuẩn gây bệnh có thể sống và phát triển ở trong nước như vi khuẩn tả, thương hàn, lỵ ... Mặt nước chịu tác dụng của ánh sáng mặt trời nên bề mặt nước nơi thoáng, nhiều ánh sáng thường ít vi khuẩn hơn nơi có rừng cây che phủ.

Nước có nhiễm phân là không đạt tiêu chuẩn nước sinh hoạt. Trong phân luôn có nhiều trực khuẩn *Escherichia coli* (xem phần "Vi hệ bình thường ở cơ thể người") nên người ta thường xác định sự có mặt của *E.coli* (chỉ số *E.coli*) để đánh giá sự ô nhiễm của nước.

1.3. Vi sinh vật trong không khí

Không khí là môi trường không thuận lợi cho vi khuẩn phát triển.

Vi sinh vật có trong không khí thường bám ở những hạt bụi nên càng nhiều bụi khả năng càng có nhiều vi sinh vật; nhưng phần lớn là nha bào, nấm và một số vi khuẩn không gây bệnh. Tuy vậy, có thể có vi khuẩn lao, từ đờm của người bị lao khô đi và bám vào hạt bụi.

Số lượng vi sinh vật có trong không khí phụ thuộc vào mật độ cư dân, số người cùng sống chung trong một không gian. Vì thế, ở thành thị không khí có nhiều vi sinh vật hơn ở nông thôn. Không khí trong bệnh viện có nhiều vi sinh vật gây bệnh hơn ở ngoài cộng đồng.

Một số vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp có thể truyền gián tiếp qua không

khí như vi khuẩn lao, vi khuẩn bạch hầu, tụ cầu vàng, virus cúm, virus sởi ...

1.4. Vi sinh vật với thực phẩm

Mặt ngoài các sản phẩm nuôi trồng như rau, quả, trứng ... đều mang vi sinh vật có nguồn gốc từ đất, nước hoặc phân động vật. Mổ thịt súc vật bằng phương pháp thủ công và rửa rau bằng nước không sạch tạo điều kiện cho thịt nhiễm vi sinh vật. Nếu xâm nhập được vào bên trong (do dập, nát, xay, ...) chúng sẽ làm thực phẩm nhanh hỏng hơn. Đáng quan tâm là một số vi sinh vật gây nhiễm trùng nhiễm độc thức ăn, đặc biệt nguy hiểm là độc tố alfatoxin do nấm *Aspergillus flavus* tiết ra và độc tố của trực khuẩn gây ngộ độc thịt (*Clostridium botulinum*).

2. Vi hệ bình thường ở cơ thể người

2.1. Đại cương

Da và niêm mạc của cơ thể người luôn có rất nhiều vi sinh vật cư trú; nó bao gồm những vi sinh vật có mặt thường xuyên tại đó và những vi sinh vật chỉ có mặt thoáng qua. Niêm mạc nói tới ở đây là niêm mạc của các khoang rỗng có liên hệ trực tiếp với môi trường như miệng, mũi, họng, âm đạo

Như vậy, những quần thể vi sinh vật tồn tại trên cơ thể người bình thường gọi là vi hệ bình thường (normal Microflora). Hầu hết những quần thể vi sinh vật đó là vi khuẩn nên người ta còn gọi chúng là hệ vi khuẩn bình thường (normal bacteriaflora).

Một số bộ phận của cơ thể như máu, các mô, cơ quan nội tạng do cấu trúc và hàng rào miễn dịch, ở điều kiện bình thường hoàn toàn không có vi sinh vật.

Số lượng các loài và số lượng cá thể của từng loài vi khuẩn thuộc vi hệ bình thường tại mỗi địa điểm thường đã không được nhìn nhận đúng. Trong thực tế, ví dụ ở da có tới $10^6/cm^2$; trong khoang miệng có tới $10^9/ml$ nước bọt; ở đại tràng có tới $10^{11}/1$ gam phân khô và trong dịch âm đạo có tới $10^7/ml$ dịch. Số lượng vi khuẩn trong dịch tá tràng và ruột non (jejunum) có ít hơn, chỉ khoảng $10^4/ml$.

Có một điều thoạt đầu thấy rất lạ là: ở chỗ nào vi khuẩn kỵ khí cũng nhiều hơn vi khuẩn ưa khí. Cụ thể: Tỷ lệ vi khuẩn kỵ khí/vi khuẩn ưa khí là khoảng 10/1 ở da, đường sinh dục ngoài, âm đạo, đường tiểu dưới; ở niêm mạc miệng là 30/1 và 100-1000/1 ở đại tràng.

Trong cuộc sống chung, các loài vi khuẩn ưa khí sử dụng oxy đã tạo ra môi trường vi khí hậu cần thiết cho các loài kỵ khí. Bằng các cơ chế khác nhau, trong điều kiện bình thường các quần thể vi sinh vật sinh sống và phát triển ở trạng thái cân bằng sinh học tại nơi cư trú.

2.2. Vai trò của vi hệ gồm những vi sinh vật có mặt thường xuyên

Những vi sinh vật luôn cư trú trên bề mặt của cơ thể là những sinh vật "vô thường vô phạt" (commensal = không có lợi và cũng không có hại). Chúng sinh sản nhiều hay ít phụ thuộc vào nhiều yếu tố sinh lý khác nhau như nhiệt độ, độ ẩm và một số chất dinh dưỡng hay chất ức chế nhất định. Cho sự sống của cơ thể thì không quan trọng, nhưng ở một số vùng của cơ thể thì vi hệ bình thường đóng vai trò nhất định trong việc giữ thăng bằng cho sức khoẻ và chức năng bình thường của cơ thể.

ở trong đường ruột, các thành viên của vi hệ sinh tổng hợp vitamin K và hỗ trợ cho việc hấp thụ thức ăn. Trên niêm mạc và da các vi sinh vật thuộc vi hệ thường xuyên có tác dụng ngăn cản sự cư trú và xâm lấn của các vi sinh vật gây bệnh, có thể do cơ chế "cạnh tranh vi sinh học".

Tuy thế, trong một số trường hợp nhất định vi sinh vật thuộc vi hệ bình thường lại có thể trở thành tác nhân gây bệnh, đó là khi môi trường thay đổi và chúng xâm nhập được vào máu hay vào mô. Ví dụ, liên cầu cư trú ở họng và đường hô hấp trên; nhưng khi một số lượng lớn vi khuẩn vào máu (do tổn thương tại chỗ) có thể gây viêm nội tâm mạc (Endocarditis). Trực khuẩn *Bacteroides* là "cư dân" ở đại tràng, nghĩa là hoàn toàn vô hại nhưng nếu chúng xâm nhập vào ổ bụng hoặc do chấn thương cùng xâm nhập với các vi khuẩn khác vào mô sẽ gây nên những nhiễm trùng có mũ và có thể dẫn đến nhiễm trùng máu.

Vì vậy, các vi sinh vật thuộc vi hệ bình thường còn được coi là những kẻ "gây bệnh cơ hội" (opportunism).

2.3. Vi hệ bình thường trong cơ thể

2.3.1. Vi hệ bình thường trên da

Do da luôn tiếp xúc với môi trường nên luôn có những vi sinh vật có mặt thoáng qua. Tuy vậy, trên da vẫn luôn có một số loài vi khuẩn có mặt thường xuyên. Chủ yếu là vi khuẩn Gram dương, thường hay gặp nhiều nhất là tụ cầu da (*Staphylococcus epidermidis*), *Propionibacterium* (kỵ khí, *P.acnes* gây mụn trứng cá). Ngoài ra còn có tụ cầu vàng (*S.aureus*), liên cầu nhóm viridans, trực khuẩn giả bạch hầu (*Corynebacterium*) và vi khuẩn sinh nha bào có trong không khí.

Tùy theo từng vùng da mà số lượng vi khuẩn có khác nhau. Vùng da đầu có nhiều vi khuẩn, song vùng mặt ngoài chi, bụng ít vi khuẩn hơn. ở những chỗ nếp gấp (nách, kẽ ngón chân) có thể có nấm và một số vi khuẩn kháng cồn và acid (*Mycobacterium*). Ngoài ra, nó còn phụ thuộc vào hoàn cảnh, tình hình vệ sinh cá nhân và nghề nghiệp của mỗi cá thể (người).

Các yếu tố trên da góp phần hạn chế sự cư trú của các vi sinh vật khác là pH thấp, acid béo trong các chất tiết của tuyến bã nhờn và sự có mặt của lysozym. Toát

mồ hôi hay tắm, rửa không thể loại trừ và thay đổi lớn vi hệ bình thường cư trú thường xuyên trên da. Số lượng vi khuẩn trên da có bị giảm đi do các biện pháp khử trùng (ví dụ tay phẫu thuật viên) nhưng nó lại trở lại bình thường nhờ dịch tiết của các tuyến mồ hôi và tuyến bã nhờn, ngay cả khi bàn tay không hề tiếp xúc với môi trường xung quanh (đeo găng phẫu thuật).

2.3.2. Vi hệ bình thường ở khoang miệng và họng

Khoang miệng có rất nhiều loại vi sinh vật: Cả vi khuẩn và nấm *Candida*, cả vi khuẩn ưa khí và kỵ khí, cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, cả cầu khuẩn, trực khuẩn và xoắn khuẩn.

Các cầu khuẩn Gram dương, ưa khí như tụ cầu, liên cầu; kỵ khí như *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*.

Các trực khuẩn Gram dương như trực khuẩn sữa (*Lactobacillus*), *Actinomycetes* (có nhiều trên lợi người trưởng thành) và *Corynebacterium*.

Các trực khuẩn Gram âm, kỵ khí như *Fusobacterium*, *Bacteroides*; ưa kỵ khí tùy tiện như cá trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*).

Xoắn khuẩn trong khoang miệng là các *Treponema* (kỵ khí) như *T.oralis*, *T.denticola* ...

Khoang miệng là môi trường thuận lợi cho các quần thể vi sinh vật này phát triển song trong thể cân bằng nhưng chúng cũng dễ trở thành căn nguyên gây nhiễm khuẩn răng miệng tại chỗ hoặc đôi khi có thể gây nhiễm khuẩn toàn thân nếu xâm nhập được vào máu (do nhổ răng). Chúng còn đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành cao răng.

Vì vậy, vệ sinh răng miệng là việc làm cần thiết, thường xuyên để hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn có khả năng gây bệnh.

2.3.3. Vi hệ đường hô hấp

Khi chào đời, hầu họng trẻ sơ sinh hầu hết là vô khuẩn. Sau 4-12 giờ bắt đầu có liên cầu và sẽ tồn tại suốt đời. ở hầu họng và khí quản cũng có những vi khuẩn gần như ở khoang miệng. Trong khi đó, do cấu tạo và hàng rào miễn dịch ở phế quản chỉ có rất ít vi khuẩn và ở phế nang, túi phổi bình thường là vô khuẩn.

Vi khuẩn hay gặp nhất ở đường hô hấp trên, đặc biệt ở họng là các liên cầu tan máu anpha và không tan máu; các cầu khuẩn Gram âm (*Neisseria*), tụ cầu, trực khuẩn giả bạch hầu, phế cầu, *Haemophilus* và *Bacteroides*. Đáng sợ là có một số trẻ em có mang liên cầu nhóm A, tan máu beta; vì đây là vi khuẩn gây viêm họng có thể gây biến chứng nguy hiểm như thấp tim, viêm cầu thận cấp (đặc biệt ở trẻ 8-10 tuổi).

Vi hệ ở mũi thường gặp là các tụ cầu (*S.aureus*, *S.epidermidis*), liên cầu và

Corynebacterium. Đáng lưu ý là tụ cầu vàng vì khả năng gây bệnh và lan truyền của nó.

2.3.4. Vi hệ đường ruột

Ở trẻ mới sinh, đường ruột là vô khuẩn; nhưng cùng với thức ăn vi sinh vật sẽ nhanh chóng có mặt. Với trẻ bú sữa mẹ, ở đường ruột có rất nhiều liên cầu và Lactobacillus; các Bifidobacterium (trực khuẩn Gram dương) sinh nhiều acid nên giữ cho pH ở khoảng 0,5. Với trẻ bú chai thì có ít Lactobacillus hơn. Khi thay đổi thức ăn, vi hệ ở đại tràng cũng thay đổi. Chế độ ăn có ảnh hưởng rõ ràng đến thành phần vi hệ ở đường ruột và trong phân của trẻ.

Ở người trưởng thành, thực quản có những vi sinh vật do thức ăn và nước bọt mang đến.

Do độ acid ở dạ dày mà số lượng vi khuẩn tồn tại ở mức ít nhất (10^3 - 10^5 /g).

Xuống ruột, độ pH kiềm đã làm cho vi hệ phong phú hơn. ở tá tràng có 10^3 - 10^6 /g; ở ruột non 10^5 - 10^8 /g. ở phần ruột trên có nhiều cầu khuẩn đường ruột (Enterococcus) và Lactobacillus; phần ruột dưới (manh tràng - hồi tràng, đại tràng) giống như ở phân; vi hệ ở trực tràng giống như ở phân và chiếm khoảng 10-20% trọng lượng phân. Khi bị tiêu chảy thì lượng vi khuẩn ít hơn nhưng bị táo bón thì lượng vi khuẩn nhiều hơn.

Trong vi hệ đại tràng ở người trưởng thành có tới 96-99% là vi khuẩn kỵ khí (Bacteroides, đặc biệt là *B.fragilis*, Bifidobacterium, Clostridium, *C.perfringens*, cầu khuẩn kỵ khí) và chỉ 1-4% là vi khuẩn ưa khí (gồm các trực khuẩn đường ruột, đặc biệt là *E.coli*, cầu khuẩn đường ruột và một số nhỏ Proteus, Pseudomonas, Lactobacillus, Candida và vi khuẩn khác).

Trên 100 loài vi khuẩn đã được tìm thấy trong vi hệ ở phân. Những chấn thương nhỏ như soi trực tràng có thể tới 10% các trường hợp gây nên vãng khuẩn huyết.

Vi hệ đường ruột có vai trò quan trọng trong việc tổng hợp vitamin K, trong chuyển đổi màu dịch mật và acid mật, trong hấp thu thức ăn và các chất chuyển hoá cũng như trong cạnh tranh chống vi sinh vật gây bệnh. Vi hệ đường ruột sinh ra amoniac và các sản phẩm khác, chúng được hấp thu và có thể góp phần dẫn đến xuất hiện hôn mê gan.

2.3.5. Vi hệ ở đường sinh dục - tiết niệu

Ngay sau khi trẻ sinh ra, các Lactobacillus đã tới âm đạo và ở lại đó. Khi pH trung tính (tuổi dậy thì) thì có cả cầu khuẩn. Các Lactobacillus chuyển hoá, tạo ra môi trường acid; đây là cơ chế quan trọng để hạn chế sự xâm nhập của các vi sinh

vật có hại ở đường âm đạo.

Vì vậy, khi dùng kháng sinh làm tiêu diệt *Lactobacillus* sẽ tạo điều kiện cho nấm *Candida* và các vi khuẩn khác có cơ hội phát triển gây kích thích và viêm.

Vi hệ bình thường ở âm đạo bao gồm *Lactobacillus* (trực khuẩn Doderlein), *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, cầu khuẩn kỵ khí (*Peptostreptococcus*), liên cầu và một số vi khuẩn khác.

ở một số phụ nữ, lối vào âm đạo có thể có những "cư dân" giống như ở vùng hậu môn. Đây là yếu tố thuận lợi tạo điều kiện gây nên nhiễm trùng đường tiêu.

ở đường niệu đạo trên (cả hai giới) có rất ít vi khuẩn, đó là những vi khuẩn có mặt ở da và số lượng có thể có thể có trong nước tiểu là 10^2 - 10^4 /ml. ở người bình thường, chỉ bên ngoài bộ phận sinh dục và ống niệu đạo dưới cùng mới có vi khuẩn. Đó là những vi khuẩn có mặt ở da như tụ cầu (*S.epidermidis*, *S.aureus*), *Corynebacterium*, liên cầu và *Mycoplasma*.

2.3.6. Vi hệ bình thường ở niêm mạc mắt

Vi khuẩn hay gặp ở mắt là trực khuẩn giả bạch hầu, trực khuẩn Gram âm nhỏ giống *Haemophilus*, *Neisseria*, tụ cầu và liên cầu không tan máu. Thông thường vi hệ ở niêm mạc mắt được kiểm soát bởi nước mắt; trong nước mắt có lysozym (có tác dụng chống vi khuẩn).

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 5. CẦU KHUẨN GÂY BỆNH

MỤC TIÊU

* Kiến thức

- Trình bày được đặc điểm sinh học của một số cầu khuẩn gây bệnh thường gặp như: tụ cầu, liên cầu, phế cầu, lậu cầu, não mô cầu.
- Trình bày khả năng gây bệnh của một số cầu khuẩn gây bệnh thường gặp như: tụ cầu, liên cầu, phế cầu, lậu cầu, não mô cầu.
- Mô tả được các phương pháp chẩn đoán, tiêu chuẩn chuẩn đoán 1 số cầu khuẩn gây bệnh thường gặp.

* Kỹ năng

- Nhận định và phân tích được kết quả định danh 1 số cầu khuẩn gây bệnh thường gặp trong 1 số bài tập tình huống.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Tụ cầu (*Staphylococcus*)

1.1. Tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*)

1.1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Tụ cầu là những cầu khuẩn, có đường kính từ 0,8-1,0 μm và đứng thành hình chùm nhỏ, bắt màu Gram dương, không có lông, không nha bào, thường không có vỏ.



(b)

Hình 8.1. *S. aureus* dưới kính hiển vi quang học (a) ; dưới kính hiển vi điện tử (b)

- Tính chất nuôi cấy

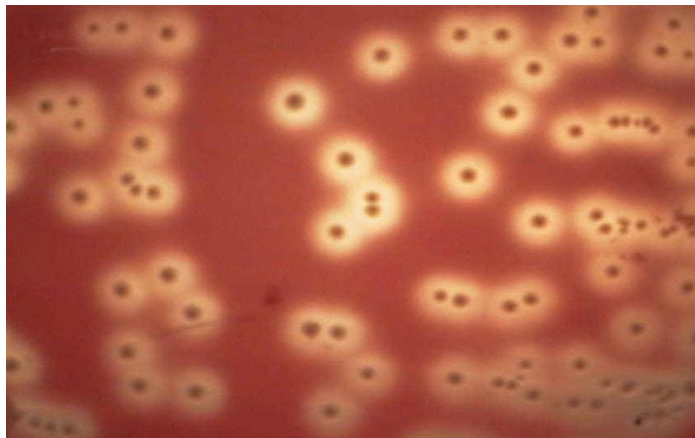
Tụ cầu vàng thuộc loại dễ nuôi cấy, phát triển được ở nhiệt độ 10 - 45°C và nồng độ muối cao tới 10%. Thích hợp được ở điều kiện hiếu và kỵ khí.

- Trên môi trường thạch thường, tụ cầu vàng tạo thành khuẩn lạc S, đường kính 1 - 2 mm, nhẵn. Sau 24 giờ ở 37°C, khuẩn lạc thường có màu vàng chanh.

- Trên môi trường thạch máu, tụ cầu vàng phát triển nhanh, tạo tan máu hoàn toàn.

Tụ cầu vàng tiết ra 5 loại dung huyết tố (hemolysin): α , β , δ , ϵ , γ .

- Trên môi trường canh thang: tụ cầu vàng làm đục môi trường, để lâu nó có thể lắng cặn.



Hình: Hình ảnh khuẩn lạc tan máu hoàn toàn

- Sức đề kháng

Tụ cầu vàng có khả năng đề kháng với nhiệt độ và hoá chất cao hơn các vi khuẩn không có nha bào khác. Nó bị diệt ở 80°C trong một giờ (các vi khuẩn khác thường bị diệt ở 60°C trong 30 phút). Khả năng đề kháng với nhiệt độ thường phụ thuộc vào khả năng thích ứng nhiệt độ tối đa (45°C) mà vi khuẩn có thể phát triển. Tụ cầu vàng cũng có thể gây bệnh sau một thời gian dài tồn tại ở môi trường.

- Độc tố và enzym

+ Protein A là protein của vách tế bào có tác dụng chống đại thực bào bằng cách gắn vào mảnh Fc của IgG ngăn cản sự gắn bổ thể và opsonin hoá.

+ Độc tố ruột là độc tố bền với nhiệt, có khả năng gây ra các hội chứng nhiễm độc thức ăn.

+ Độc tố gây hội chứng sốc nhiễm độc là nguyên nhân chính của hội chứng này. Người ta cho rằng, nó gây ra sự giải phóng yếu tố hoại tử mô và Interleukin-I, đó cũng là cơ chế gây sốc do nội độc tố.

+ Exfoliatin toxin hay epidermolytic toxin

Đây là một ngoại độc tố. Nó gây nên hội chứng phỏng rộp và chóc lở da (Scaded

skin syndrome) ở trẻ em. Hội chứng này đã được biết khá lâu, nhưng mãi đến năm 1971 người ta mới biết đến exfoliatin. Độc tố này được tạo bởi gen của 85% của các chủng tụ cầu vàng thuộc loại phage nhóm II.

Là một ngoại độc tố do gen nằm trên plasmid mã hoá, gây ra hội chứng da bong.

+ Độc tố alpha: Làm ly giải bạch cầu đa nhân và tiểu cầu hình thành các ổ áp xe.

+ Enzym β -lactamase là một yếu tố độc lực của hầu hết các chủng *S. aureus* tạo ra sự đề kháng với penicillin G. Gen mã hoá cho enzym này nằm trên plasmid có thể lan truyền được.

Các protein gắn penicillin có ở một số *S. aureus*. Chúng tạo ra sự đề kháng của vi khuẩn với các kháng sinh nhóm β -lactam.

1.1.2. Khả năng gây bệnh

Tụ cầu vàng thường ký sinh ở mũi họng và có thể cả ở da. Vi khuẩn này gây bệnh cho người bị suy giảm đề kháng hoặc chúng có nhiều yếu tố độc lực. Tụ cầu vàng là vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất và có khả năng gây nhiều loại bệnh khác nhau.

* **Nhiễm khuẩn ngoài da**

Do tụ cầu vàng ký sinh ở da và niêm mạc mũi, nên nó có thể xâm nhập qua các lỗ chân lông, chân tóc hoặc các tuyến dưới da. Sau đó gây nên các nhiễm khuẩn sinh mủ: mụn nhọt, đầu đinh, các ổ áp xe, eczema, hậu bối... Mức độ các nhiễm khuẩn này phụ thuộc vào sự đề kháng của cơ thể và độc lực của vi khuẩn. Nhiễm tụ cầu ngoài da thường gặp ở trẻ em và người suy giảm miễn dịch. Hậu bối và đinh râu có thể gây nên các biến chứng nguy hiểm.

* **Nhiễm khuẩn huyết**

Tụ cầu vàng là vi khuẩn thường gây nhiễm khuẩn huyết nhất. Do chúng gây nên nhiều loại nhiễm khuẩn, đặc biệt là các nhiễm khuẩn ngoài da, từ đây vi khuẩn xâm nhập vào máu gây nên nhiễm khuẩn huyết. Đây là một nhiễm trùng rất nặng. Từ nhiễm khuẩn huyết, tụ cầu vàng đi tới các cơ quan khác nhau và gây nên các ổ áp xe (gan, phổi, não, tuỷ xương...) hoặc viêm nội tâm mạc. Có thể gây nên các viêm tắc tĩnh mạch. Một số nhiễm trùng khu trú này trở thành viêm mạn tính như viêm xương...

* **Viêm phổi**

Viêm phổi do tụ cầu vàng ít gặp. Nó chỉ xảy ra sau viêm đường hô hấp do virus (như cúm) hoặc sau nhiễm khuẩn huyết. Tuy vậy cũng có viêm phổi tiên phát do tụ cầu vàng, ở trẻ em hoặc những người suy yếu. Tỷ lệ tử vong của bệnh này khá cao, vì thế nó được coi là bệnh nặng.

* **Nhiễm độc thức ăn và viêm ruột cấp**

Ngộ độc thức ăn tụ cầu có thể do ăn uống phải độc tố ruột của tụ cầu, hoặc do tụ cầu vàng vốn cư trú ở đường ruột chiếm ưu thế về số lượng. Nguyên nhân là sau một thời gian dài bệnh nhân dùng kháng sinh có hoạt phổ rộng, dẫn đến các vi khuẩn chí bình thường của đường ruột nhạy cảm kháng sinh bị tiêu diệt và tạo điều kiện thuận lợi cho tụ cầu vàng (kháng kháng sinh) tăng trưởng về số lượng.

Triệu chứng của ngộ độc thức ăn do tụ cầu thường rất cấp tính. Sau khi ăn phải thức ăn nhiễm độc tố tụ cầu từ 2 đến 8 giờ, bệnh nhân nôn và đi ngoài dữ dội, phân lẫn nước, cặn về sau phân và chất nôn chủ yếu là nước. Do mất nhiều nước và điện giải có thể dẫn tới shock. Ngộ độc thức ăn do tụ cầu vàng là một trong những ngộ độc thức ăn rất thường gặp ở Việt Nam.

* **Nhiễm khuẩn bệnh viện do tụ cầu:** rất thường gặp, nhất là đối với nhiễm trùng vết mổ, vết bỏng... từ đó dẫn tới nhiễm khuẩn huyết. Các chủng tụ cầu này có khả năng kháng kháng sinh rất mạnh và phải dùng tới vancomycin. Tỷ lệ tử vong của bệnh này rất cao.

* **Độc tố gây hội chứng shock nhiễm độc** (*Toxic shock syndrome toxin - TSST*)

Độc tố gây shock nhiễm độc thường gặp ở những phụ nữ có kinh dùng băng băng dày bản hoặc những người bị nhiễm trùng vết thương. Độc tố này khó phân biệt với enterotoxin F của tụ cầu vàng. TSST kích thích giải phóng TNF (Tumor necrosis factor, yếu tố hoại tử u) và các interleukin I, II. Cơ chế gây shock của nó tương tự như của nội độc tố.

1.1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm: máu, mủ, phân... tùy theo loại bệnh của tụ cầu.
- Chẩn đoán trực tiếp

Phân lập xác định tụ cầu là việc cần thực hiện và không mấy khó khăn.

Thạch máu là môi trường thích hợp để phân lập. Tụ cầu phát triển rất tốt trên môi trường này. Có thể sử dụng môi trường lựa chọn chứa 7,5% NaCl, đường mannitol và có thể có cả kháng sinh chống vi khuẩn Gram âm, khi bệnh phẩm có nhiều loại vi khuẩn. Sau đó xác định các tính chất:

- + Khuẩn lạc S và màu vàng nhẹ.
- + Cầu khuẩn Gram dương, đứng thành hình chùm nho.
- + Coagulase dương tính.
- + Mannitol dương tính.
- + Kháng novobiocin.
- + Phosphatase dương tính.
- + Catalase dương tính.

- Chẩn đoán gián tiếp

Các phản ứng huyết thanh ít có giá trị thực tế trừ một số bệnh tụ cầu mạn tính ở các tổ chức xương

1.1.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh nhiễm khuẩn tụ cầu chủ yếu là vệ sinh môi trường, quần áo và thân thể vì tụ cầu có rất nhiều ở những nơi này. Đặc biệt là vệ sinh môi trường bệnh viện để chống nhiễm khuẩn bệnh viện.

Kháng sinh trị liệu là biện pháp chủ yếu. Vấn đề khó khăn là tụ cầu rất kháng thuốc, nên cần phải làm kháng sinh đồ để chọn lọc thuốc thích hợp (xem mục 1.4.). Dùng Vaccin gây miễn dịch chống tụ cầu vàng cũng là một biện pháp cần thiết ở những bệnh nhân dùng kháng sinh ít kết quả. Đây là những Vaccin chết và có thể được bào chế từ chủng tụ cầu vàng phân lập được ở chính bệnh nhân đó (gọi là Vaccin tự liệu), hoặc dùng các chủng tụ cầu vàng mẫu, là những chủng thường gặp (gọi là Vaccin trị liệu).

1.2. Tụ cầu không đông huyết tương

- *S. epidermidis*

- *S. saprophyticus*

1.2.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

S. epidermidis: là những cầu khuẩn, có đường kính từ 1-2 μ m và đứng thành hình chùm nhỏ, bắt màu Gram dương, không có lông, không nha bào, không có vỏ

S. saprophyticus: là những cầu khuẩn, có đường kính từ 1-2 μ m và tập trung theo từng cặp hoặc tập hợp lỏng lẻo, bắt màu Gram dương, không có lông, không nha bào, không có vỏ

- Tính chất nuôi cấy

Tụ cầu khuẩn thuộc loại vi khuẩn hô hấp hiếu khí kỵ khí tùy tiện, phát triển dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường. Tụ cầu có khả năng phát triển được ở khoảng nhiệt độ dao động từ 10 - 45 $^{\circ}$ C và môi trường có nồng độ muối cao tới 10%.

+ Trong môi trường canh thang sau 5 - 6 giờ vi khuẩn đã phát triển mạnh và làm đục đều môi trường, để lâu đáy có lắng cặn.

+ Trên môi trường thạch thường khuẩn lạc dạng S, đường kính 1 - 2mm, sau 24 giờ khuẩn lạc có màu trắng (đối với các loại tụ cầu khác).

+ Trên môi trường thạch máu tụ cầu phát triển nhanh: Khuẩn lạc tụ cầu: dạng S, kích thước khoảng 1 - 2mm, có màu trắng và thường không gây tan máu.

- Sức đề kháng

Khả năng đề kháng với nhiệt độ thường phụ thuộc vào khả năng thích ứng nhiệt độ tối đa (45°C) mà vi khuẩn có thể phát triển

- Độc tố và enzym

+ Kháng nguyên adherin (yếu tố bám): Đây là một protein bề mặt đặc hiệu của tụ cầu có tác dụng bám vào các điểm tiếp nhận đặc hiệu của tế bào.

+ Hầu hết các chủng tụ cầu đều sản xuất được men penicillinase (beta- lactamase). Enzym này phá hủy vòng beta-lactam, cấu trúc cơ bản của các kháng sinh như penicilline G, Ampicilline và Ureidopenicilline, làm cho các kháng sinh này mất tác dụng.

1.2.2. Khả năng gây bệnh

- *S. epidermidis*

+ Nhiễm trùng bệnh viện: Vi khuẩn thường gây nhiễm trùng catheter và khớp giả.

+ Viêm nội tâm mạc

- *S. saprophyticus*

+ Nhiễm trùng đường tiết niệu thứ phát và hay gặp ở phụ nữ trẻ (16-30 tuổi).

1.2.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm: lấy qua da (máu, dịch não tuỷ...)

- Chẩn đoán trực tiếp

S. epidermidis

Cầu khuẩn Gram (+)

Khuẩn lạc màu trắng

Không tan máu

Catalase (+)

Coagulase (-)

Nhạy cảm với novobiocin

S. saprophyticus

Cầu khuẩn Gram (+)

Không tan máu

Catalase (+)

Coagulase (-)

Đề kháng với novobiocin

- Chẩn đoán gián tiếp

Các phản ứng huyết thanh ít có giá trị thực tế trừ một số bệnh tụ cầu mạn tính ở các tổ chức xương

1.2.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh nhiễm khuẩn tụ cầu chủ yếu là vệ sinh môi trường, quần áo và thân thể vì tụ cầu có rất nhiều ở những nơi này. Đặc biệt là vệ sinh môi trường bệnh viện để chống nhiễm khuẩn bệnh viện.

Kháng sinh trị liệu là biện pháp chủ yếu. Vấn đề khó khăn là tụ cầu rất kháng thuốc, nên cần phải làm kháng sinh đồ để chọn lọc thuốc thích hợp (xem mục 1.4.). Dùng Vaccin gây miễn dịch chống tụ cầu vàng cũng là một biện pháp cần thiết ở những bệnh nhân dùng kháng sinh ít kết quả. Đây là những Vaccin chết và có thể được bào chế từ chủng tụ cầu vàng phân lập được ở chính bệnh nhân đó (gọi là Vaccin tự liệu), hoặc dùng các chủng tụ cầu vàng mẫu, là những chủng thường gặp (gọi là Vaccin trị liệu).

2. Liên cầu (*Streptococcus*)

2.1. Đặc điểm sinh học:

2.1.1. Hình thể

Là các cầu khuẩn Gram (+) xếp thành chuỗi, hiếu kỵ khí tùy tiện, catalase (-).

Các nhiễm trùng do liên cầu thường sinh mủ, là mối quan tâm đặc biệt của những người bị cắt lách.

Tất cả các liên cầu đều có carbohydrate C trong thành phần của vách trừ nhóm *Viridans* và *Streptococcus pneumoniae*.

Các liên cầu được xếp thành các nhóm (nhóm A-T của Lancefield) dựa trên sự khác biệt về tính kháng nguyên của carbohydrate C. Nhóm chính là A, B và D.

2.2.2. Tính chất nuôi cấy

- Điều kiện:

+ Hiếu khí, kỵ khí tùy ý

+ Phát triển ở môi trường có máu hoặc có dịch của cơ thể khác

+ Phát triển ở 37 độ c (liên cầu tan máu), từ 10- 45 độ c (liên cầu ruột)

- Môi trường đặc (thạch máu)

+ Khuẩn lạc nhỏ tròn màu hơi xám, bóng hoặc mờ đục

+ Liên cầu A có vỏ tạo khuẩn lạc nhầy

- Môi trường lỏng:

+ Vi khuẩn dễ tạo chuỗi

+ Sau 24h canh thang trong và có hạt

+ Cụm dính thành ống sau đó lắng xuống đáy

2.2.3. Sức đề kháng

- Kháng nguyên vỏ acid hyaluronic

- Kháng nguyên carbohydrat C đặc hiệu nhóm
- Kháng nguyên M đặc hiệu typ
- Phẩm vật T

2.2.4. Độc tố và enzym

Các cấu trúc phân tử bề mặt, độc tố, enzym:

Pili: Là các yếu tố độc lực cho phép vi khuẩn bám vào niêm mạc đường hô hấp.

Protein M: Là một phân tử bề mặt có tác dụng kháng đại thực bào tạo ra miễn dịch đặc hiệu typ. Có hơn 70 typ kháng nguyên.

Streptokinase: Có tác dụng làm tan các cục máu đông do chuyển plasminogen thành plasmin. Được dùng để điều trị nhồi máu cơ tim.

Streptolysin O: Là yếu tố gây tan máu, bị bất hoạt bởi oxi, kích thích cơ thể tạo kháng thể.

Streptolysin S: Gây tan máu β trên thạch máu.

Tất cả liên cầu nhóm A nhạy cảm với penicillin G.

S. pyogenes là liên cầu duy nhất nhạy cảm với bacitracin.

Độc tố gây phát ban: Gây sốt phát ban, sinh ra do một pha ly giải ôn hoà của một số chủng *S. pyogenes*.

2.2. Khả năng gây bệnh

2.2.1. Bệnh do liên cầu nhóm A

Viêm họng: Biểu hiện bằng đau họng, đau đầu, sốt, mệt mỏi và thường tự khỏi. Trước kia, người ta thường mô tả thêm các triệu chứng như phát ban, hai amidal sưng to và có dịch mủ màu trắng xám. Bệnh có thể lây truyền qua đường hô hấp bằng những giọt nước bọt.

Sốt hồng ban (Scarlet fever): Xảy ra ở những bệnh nhân bị viêm họng do chủng *S. pyogenes* có độc tố phát ban. Triệu chứng đặc trưng là ban đỏ toàn thân giống như “mảnh giấy ráp”, lưỡi giống như “quả dâu tây”. Vi khuẩn cư trú ở họng nhưng độc tố khuếch tán khắp cơ thể.

Bệnh viêm da mủ: Là bệnh nhiễm trùng của da, dễ lây, biểu hiện bằng những vết loét màu vàng, cứng trên da khắp cơ thể. Bệnh phổ biến ở trẻ em.

Đường lây lan qua tiếp xúc trực tiếp với tổn thương hoặc qua đồ dùng, quần áo không đảm bảo vệ sinh.

Những biến chứng không sinh mủ:

+ **Thấp khớp cấp:** Là một bệnh toàn thân biểu hiện bằng những tổn thương viêm xuất hiện ở tim, khớp, mô dưới da và hệ thống thần kinh trung ương. Bệnh

thường xuất hiện sau viêm họng do liên cầu nhóm A.

Do sự phản ứng chéo giữa các kháng thể kháng liên cầu với các kháng nguyên của khớp và tim. Đây là một ví dụ về phản ứng quá mẫn tít II. Bệnh có thể phòng bằng cách điều trị penicillin trong 9 ngày kể từ khi phát bệnh.

+ Viêm cầu thận cấp: Là giai đoạn đầu của hội chứng thận cấp. Bệnh có các triệu chứng như phù, tăng huyết áp, nước tiểu hơi nâu. Bệnh là kết quả của sự phá huỷ tổ chức do sự tích tụ các phức hợp kháng nguyên kháng thể ở màng đáy của tiểu cầu thận. Đây là một ví dụ về phản ứng quá mẫn tít III.

Viêm cầu thận cấp thường xuất hiện sau nhiễm trùng do liên cầu nhóm A từ 7-21 ngày. Bệnh phổ biến ở trẻ em từ 3-10 tuổi. ở các trẻ dưới 6 tuổi, viêm cầu thận cấp thường sau viêm da mủ nhưng ở các trẻ lớn hơn hoặc thanh niên, bệnh thường là biến chứng của viêm họng.

2.2.2. Bệnh do liên cầu nhóm D

Liên cầu nhóm D là một thành viên của vi khuẩn chí bình thường ở đường ruột, tuy vậy liên cầu nhóm D có thể gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, đôi khi gây viêm màng tim.

2.2.3. Bệnh do liên cầu B

Liên cầu nhóm B là thành phần khuẩn chí bình thường của đường tiêu hoá.

Liên cầu nhóm B là thành phần khuẩn chí bình thường tại âm đạo ở 5-35% tất cả các phụ nữ.

Các nhiễm trùng sơ sinh: Có hai nhóm: Khởi phát sớm và muộn.

- Khởi phát sớm: Xuất hiện trong vòng 48 giờ, biểu hiện bằng viêm phổi và nhiễm trùng huyết. Tỷ lệ tử vong 50-60%. lây truyền từ mẹ sang con khi sinh. Đây là nguyên nhân thường gặp nhất của nhiễm trùng huyết sơ sinh ở Mỹ.

- Khởi phát muộn: Thường biểu hiện viêm màng não. Xuất hiện vào ngày thứ 10-60 sau khi sinh. Nói chung không phải là nhiễm trùng trầm trọng.

Nguyên nhân có thể do nhiễm trùng bệnh viện.

Viêm nội mạc tử cung sau đẻ

Viêm màng ối

2.2.4. Bệnh do liên cầu viridans

Là thành phần khuẩn chí bình thường của họng miệng.

Viêm nội tâm mạc bán cấp do vi khuẩn: Có thể xảy ra ở những người sau nhổ răng mà trước đó có tiền sử tổn thương van tim. Những đối tượng này cần được phòng bệnh bằng kháng sinh. Gây huyết khối, tiếng thổi ở tim và thiếu máu.

Sâu răng: Do *S. mutans* tạo ra đường dextran là một thành phần của mảng

bám răng

2.3. Chẩn đoán vi sinh

2.3.1. Chẩn đoán trực tiếp

*** Bệnh phẩm**

Tùy từng thể bệnh mà chúng ta lấy các bệnh phẩm ở từng vị trí khác nhau. Ví dụ như: bệnh phẩm họng miệng, máu, nước não tủy, dịch ổ áp xe hoặc mủ. Tất cả các loại bệnh phẩm đều phải cấy ngay vào môi trường nuôi cấy thích hợp, chậm nhất cũng không được quá 3 giờ.

*** Phân lập và xác định liên cầu**

Nhuộm Gram: Trên tiêu bản nhuộm Gram, vi khuẩn có hình cầu, bắt màu Gram dương, xếp thành chuỗi.

Nuôi cấy phân lập: Bệnh phẩm máu hoặc nước não tủy được cấy vào bình canh thang glucose ủ ở nhiệt độ 37°C, theo dõi và đọc kết quả hàng ngày; nếu tới ngày thứ 15, không thấy vi khuẩn mọc thì kết luận mẫu bệnh phẩm âm tính. Nếu bình nuôi cấy dương tính (có vi khuẩn mọc) thì xác định tính chất sinh vật hoá học để xác định vi khuẩn. Các bệnh phẩm khác được cấy vào môi trường thạch máu.

Để xác định vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh học như: dạng tan máu, thử nghiệm bacitracin, đồng ngưng kết và ngưng kết latex để chẩn đoán phân biệt giữa liên cầu nhóm A với liên cầu tan máu bê ta (β) khác. Thử nghiệm optochin, neufeld để phân biệt liên cầu tan máu alpha (α) với phế cầu. Thử nghiệm xác định enzyme catalase để chẩn đoán phân biệt với tụ cầu.

Ngoài ra, hiện nay còn có phương pháp chẩn đoán nhanh liên cầu nhóm A từ tăm bông ngoáy họng, bằng cách sử dụng phản ứng ngưng kết latex. Phương pháp này có độ đặc hiệu cao nhưng độ nhạy kém, song cho kết quả nhanh, chỉ sau 10 phút

2.3.2. Chẩn đoán gián tiếp

Các nghiên cứu xác định kháng thể chống lại kháng nguyên ngoài tế bào được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán phát hiện nhiễm liên cầu nhóm A trước đó. Đặc biệt, xét nghiệm antistreptolysin O (ASLO) phát hiện kháng thể kháng streptolysin O, là xét nghiệm được sử dụng trong chẩn đoán bệnh thấp tim và viêm cầu thận cấp ở trẻ em. Ngưỡng giới hạn bất thường ở trẻ em học đường Việt Nam là: trên 240 đơn vị Todd.

2.4. Nguyên tắc phòng và điều trị

Hiện nay chưa có Vaccin phòng bệnh hữu hiệu, vì vậy chủ yếu vẫn là phòng

bệnh không đặc hiệu. Cần phát hiện sớm những ổ nhiễm khuẩn ở da, ở họng do liên cầu nhóm A gây nên để điều trị kịp thời, tránh những nhiễm trùng thứ phát.

Hiện nay theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới: penicillin vẫn là kháng sinh được lựa chọn hàng đầu để điều trị liên cầu nhóm A. Trong trường hợp bệnh nhân bị dị ứng với penicillin, có thể thay thế bằng erythromycin. Liên cầu viridans, liên cầu đường ruột kháng kháng sinh mạnh, do đó điều trị phải dựa vào kháng sinh đồ.

3. Phế cầu (*S. pneumoniae*)

3.1. Đặc điểm sinh học

3.1.1. Hình thể

Phế cầu là những cầu khuẩn dạng ngọn nến, thường xếp thành đôi, ít khi đứng riêng lẻ, đường kính khoảng 0,5-1,25 μm . Trong môi trường nuôi cấy thường xếp thành chuỗi ngắn (dễ lầm với liên cầu). Gram dương, không di động, không sinh nha bào, trong bệnh phẩm hay trong môi trường nhiều albumin thì có vỏ (Hình 56).



(a)

(b)

Hình 8.4: *S. pneumoniae* dưới kính hiển vi quang học (a) và dưới kính hiển vi điện tử (b)

3.1.2. Tính chất nuôi cấy

Vi khuẩn thích hợp ở 37°C, hiếu khí và kỵ khí tùy tiện. Vi khuẩn mọc dễ dàng trong các môi trường có nhiều chất dinh dưỡng. Trên thạch máu, khuẩn lạc tròn, lồi, bóng, trong như giọt sương, xung quanh có vòng tan máu tít α . Trên môi trường nghèo, phế cầu kém phát triển; khuẩn lạc khô, nhỏ, xù xì. Những khuẩn lạc có vỏ thường lớn, hơi nhầy và có màu xám nhẹ. Có thể có dạng khuẩn lạc trung gian M.

3.1.3. Sức đề kháng

Dễ bị tiêu diệt bởi hoá chất sát khuẩn thông thường và nhiệt độ (60°C trong 30 phút). Trong quá trình giữ giống, vi khuẩn dễ bị giảm độc lực hoặc biến đổi từ dạng khuẩn lạc S sang dạng R (không có vỏ). Phế cầu không chịu được nhiệt độ quá lạnh và quá

nóng. Nhiệt độ giữ chủng thích hợp là 18°C - 30°C.

3.2.4. Độc tố và enzym

Phế cầu bị ly giải bởi mật hoặc muối mật (thử nghiệm Neufeld), không có catalase. Vi khuẩn không phát triển được trong môi trường có ethylhydrocuprein (test optochin dương tính).

3.2. Khả năng gây bệnh

- Thường gặp phế cầu ở vùng tự hầu của người lành với tỷ lệ khá cao (khoảng 40-70%). Phế cầu có thể gây nên bệnh viêm đường hô hấp, điển hình là viêm phổi. Viêm phổi do phế cầu thường xảy ra sau khi đường hô hấp bị tổn thương do nhiễm virus (như virus cúm) hoặc do hoá chất. Các týp thường gây bệnh là 1, 2 và 3 (đôi với người lớn) và 1, 6, 14 (với trẻ em). Tuy vậy ở các vùng khác nhau các týp có thể thay đổi. Ngoài ra, phế cầu còn gây viêm tai, viêm xoang, viêm họng, viêm màng não, viêm màng bụng, màng tim, viêm thận, viêm tinh hoàn, nhiễm khuẩn huyết và rất thường gây viêm màng não ở trẻ em. Phế cầu là một trong những vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất.

- Ở các nơi tổn thương, phế cầu hình thành một lớp vỏ dày, ngăn cản hiện tượng thực bào, có nhiều fibrin quanh chỗ tổn thương, tạo nên một vùng cách biệt, làm cho thuốc kháng sinh khó tác dụng, mặc dù những vi khuẩn này vẫn nhạy cảm với nhiều kháng sinh. Do đó, chữa bệnh bằng kháng sinh phải sớm và triệt để.

3.3. Chẩn đoán vi sinh

3.3.1. Bệnh phẩm: lấy từ họng mũi bằng tăm bông mềm hoặc máu (nếu nghi nhiễm khuẩn huyết) hoặc chất hút từ phổi...

3.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Đây là phương pháp tốt nhất để xác định phế cầu gây bệnh. Bệnh phẩm có thể lấy từ họng mũi bằng tăm bông mềm hoặc máu (nếu nghi nhiễm khuẩn huyết) hoặc chất hút từ phổi... Nếu bệnh phẩm là dịch phế quản hoặc dịch hầu họng, nó được cấy vào môi trường thạch máu có gentamicin (5 µg/ml). Phế cầu có khuẩn lạc: S, nhầy, đường kính 1-2 mm, có chóp và tan máu α. Sau 18 giờ nuôi cấy, hình chóp của khuẩn lạc bị mất đi và khuẩn lạc trở nên lõm xuống. Điều này giúp ta phân biệt với *S. viridans*, là vi khuẩn rất thường gặp trong bệnh phẩm họng mũi và cũng tan máu α.

Người ta thường phân biệt phế cầu với liên cầu bằng test optochin. Phế cầu thường nhạy cảm và đường kính vòng vô khuẩn từ 14 mm trở lên. Còn liên cầu thì không nhạy cảm với test này. Cũng có thể thay optochin bằng mật bò. Phế cầu bị dung giải bởi mật bò còn liên cầu thì ngược lại.

Để xác định độc lực của phế cầu (nhằm phân biệt với các chủng ký sinh)

thường phải tiêm vi khuẩn vào phúc mạc của chuột bạch, sau khi chuột chết phân lập lại vi khuẩn từ máu của tim chuột. Nếu phân lập được vi khuẩn thì chắc chắn là phé cầu có độc lực. Người ta cũng có thể xác định vỏ của vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm vỏ hoặc dùng phản ứng phình vỏ (Quellung). Khi kháng thể kháng vỏ kết hợp với vỏ nó sẽ làm cho lớp vỏ của vi khuẩn phình to lên và người ta có thể quan sát bằng phương pháp nhuộm vỏ.

3.3.3. Chẩn đoán gián tiếp

Loại phản ứng này không có ý nghĩa trong chẩn đoán phé cầu và không được dùng trong phòng thí nghiệm.

3.4. Nguyên tắc phòng và điều trị

Phé cầu thường lây theo đường hô hấp cho nên việc phòng bệnh không đặc hiệu, rất khó khăn. Phòng bệnh đặc hiệu đã được sử dụng ở một số nước tiên tiến bằng Vaccin polysaccharid của vỏ phé cầu. Người ta thường sử dụng vỏ của một số týp huyết thanh thường gây bệnh. Vaccin này có tác dụng bảo vệ nhưng không hoàn toàn, bởi lẽ nó không đầy đủ các týp huyết thanh, nhưng nó có tác dụng ngăn cản những nhiễm phé cầu nặng (viêm màng não mủ, hoặc nhiễm khuẩn huyết). Vì Vaccin thường bao gồm những týp huyết thanh gây bệnh nặng này. Hiện nay Vaccin này đã có ở Việt Nam do các hãng nước ngoài đưa vào.

Phé cầu nói chung vẫn là một vi khuẩn còn nhạy cảm với các kháng sinh thường dùng. Người ta thường dùng penicillin, cũng có thể dùng cephalosporin.

Điều đáng lưu ý ở đây là sự kháng kháng sinh của phé cầu ngày càng gia tăng, đặc biệt với penicillin G, chloramphenicol và cotrimoxazol.

Phé cầu kháng penicillin không phải bằng β -lactamase như nhiều vi khuẩn khác, mà bằng cách thay đổi 1 trong 6 protein gắn penicillin (PBP - penicillin binding protein). Hậu quả là làm giảm ái lực gắn PBP với thuốc, nhưng vẫn đảm bảo được chức năng transpeptidase cần thiết để xúc tác cho tổng hợp peptidoglycan của vách vi khuẩn. Cần có một lượng penicillin đủ lớn mới ức chế được vi khuẩn. Sự đề kháng này thường do biến cố di truyền (biến nạp plasmid hoặc transposon).

4. Lậu cầu (*Neisseria gonorrhoeae*)

4.1. Đặc điểm sinh học

4.1.1. Hình thể

Vi khuẩn lậu là những song cầu hình hạt cà phê, bắt màu Gram âm. Trong các trường hợp lậu điển hình, vi khuẩn lậu đứng trong tế bào như lèn chặt vào bạch cầu đa nhân trung tính thoái hoá. Trong trường hợp lậu mạn tính, vi khuẩn đứng ngoài tế bào và ít trong tế bào.

Trong môi trường nuôi cấy, vi khuẩn lậu đa dạng, kích thước thay đổi và sắp xếp không điển hình.



Hình 9.1. *Neisseria gonorrhoeae* dưới kính hiển vi quang học

4.1.2. Nuôi cấy

Vi khuẩn lậu khó nuôi cấy. Khi ra khỏi cơ thể, vi khuẩn lậu rất dễ chết. Vi khuẩn lậu không phát triển được trong các môi trường thông thường mà đòi hỏi giàu chất dinh dưỡng như máu, huyết thanh và các yếu tố dinh dưỡng khác. Các môi trường được sử dụng là thạch chocolat, Martin-Thayer, Martin-Lewis. Các môi trường này thường có các kháng sinh để ức chế các vi khuẩn khác nhưng không ảnh hưởng tới vi khuẩn lậu.

Điều kiện nuôi cấy lậu cầu: Vi khuẩn lậu đòi hỏi khí trường 3-10% CO₂, ở 35° - 37 °C với 70% độ ẩm, pH 7,3.

Hình dạng khuẩn lạc: Sau 24 giờ kích thước khuẩn lạc từ 0,4 - 1 mm, xám trắng, mờ đục, lồi, lấp lánh sáng. Nếu để 48 - 72 giờ, khuẩn lạc tới 3 mm.

4.1.3. Sức đề kháng

Vi khuẩn lậu dễ bị bất hoạt khi ở điều kiện ngoại cảnh tế bào: 55°C vi khuẩn lậu chết sau 5 phút; trong điều kiện khô và giàu oxy, vi khuẩn lậu chết sau 1 - 2 giờ. Nhiệt độ lạnh và khô, vi khuẩn lậu chết nhanh, do vậy không bao giờ giữ bệnh phẩm ở điều kiện lạnh.

Với hoá chất: phenol 1%, mercuric chloric 0,01%, formol 0,1%, sublime 0,1% vi khuẩn chết sau 1- 5 phút tiếp xúc.

4.2. Khả năng gây bệnh

Vi khuẩn lậu chỉ có vật chủ duy nhất là người. Bệnh liên quan chặt chẽ với hoạt động tình dục. Vi khuẩn lậu gây viêm niệu đạo cho cả nam và nữ. Triệu chứng điển hình là đái mủ, đái khó, chảy mủ niệu đạo. Nhưng cũng có khoảng 1/5 số người không có triệu chứng điển hình. ở phụ nữ, triệu chứng phức tạp hơn: tiết dịch niệu đạo, âm đạo. Vị trí bệnh ở phụ nữ thường ở cổ tử cung, tuyến Skene, tuyến Bartholin, có khi tới cả tử cung, vòi trứng, buồng trứng.

Viêm trực tràng: thường gặp ở những người đồng tính luyến ái nam. Triệu

chứng viêm trực tràng do lậu thường không điển hình.

Nhiễm lậu cầu ở họng: gặp ở đồng tính luyến ái cả hai giới hoặc khác giới. Bệnh lậu ở trẻ em: thường biểu hiện lậu ở mắt do lây vi khuẩn từ mẹ trong thời kỳ chu sinh, phổ biến nhất là chảy mủ kết mạc sau đẻ 1-7 ngày. Nếu không được điều trị kịp thời, có thể dẫn tới mù.

Nhiễm lậu cầu lan toả: bệnh thường gặp ở những người bị lậu nhưng không được điều trị, hầu hết xảy ra ở phụ nữ. Biểu hiện của bệnh viêm khớp, viêm gan, viêm cơ tim, viêm nội tâm mạc, viêm màng não.

4.3. Chẩn đoán vi sinh

4.3.1. Bệnh phẩm: mủ niệu đạo hoặc dịch tử cung

4.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Phương pháp nhuộm soi trực tiếp: người ta thường dùng phương pháp này để đánh giá hình thể, tính chất bắt màu, cách sắp xếp (đứng trong hay ngoài tế bào). Phương pháp này dùng bệnh phẩm là mủ niệu đạo hoặc dịch cổ tử cung có giá trị chẩn đoán cao.

Chẩn đoán lậu mạn tính: ít thấy vi khuẩn và nếu thấy có, vi khuẩn thường nằm ngoài tế bào rất khó phân biệt với các vi khuẩn không gây bệnh khác; những trường hợp này, cần phải tiến hành nuôi cấy.

Nuôi cấy: lựa chọn môi trường thích hợp: chocolat, Martin-Thayer có chất tăng sinh và chất ức chế. Khí trường 3-10% CO₂, độ ẩm 70%, pH 7,3; nhiệt độ 35°-37°C. Sau khi nuôi cấy, tiến hành xác định vi khuẩn bằng các thử nghiệm: oxidase, catalase, chuyển hoá đường.

4.3.2. Chẩn đoán gián tiếp

- Tìm kháng thể kháng lậu bằng kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang.
- Kỹ thuật PCR.
- Tìm IgM bằng ELISA để chẩn đoán lậu ngoài đường sinh dục.

4.4. Nguyên tắc phòng và điều trị

Chủ yếu là giải quyết nạn mại dâm. Phòng các bệnh lây do tiếp xúc: bao cao su.

Ngoài ra, cần điều trị triệt để cho người bệnh nhất là phụ nữ có thai để tránh lây sang trẻ sơ sinh.

Hiện nay, lậu đã bắt đầu kháng lại nhiều kháng sinh, do đó phải làm kháng sinh đồ để lựa chọn kháng sinh thích hợp cho việc điều trị bệnh. Cần điều trị triệt để để tránh chuyển sang lậu mạn tính, rất khó chẩn đoán và điều trị.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. *N.gonorrhoeae* có đặc điểm
 - A. Gây nhiễm trùng mũ cơ quan sinh dục, viêm mũ kết mạc mắt ở trẻ sơ sinh.
 - B. Gây bệnh bằng ngoại độc tố.
 - C. Song cầu gram (+).
 - D. Nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh.
2. Tính chất nào của *S. aureus*
 - A. Tính độc của *S. aureus* là do vỏ quyết định.
 - B. *S. aureus* phải mọc trên môi trường giàu chất dinh dưỡng .
 - C. Trên môi trường thạch thường, mọc thành khuẩn lạc màu trắng.
 - D. *S. aureus* có coagulase (+), thường là loại không gây bệnh cho người.
 - E. Trên môi trường thạch máu *S. aureus* thường gây tan máu hoàn toàn.
3. Tiêu chuẩn dùng để chẩn đoán phân biệt *S. aureus* với các *staphylococcus* khác trong nhóm
 - A. Catalase
 - B. Lên men đường manitol.
 - C. Phosphatase kiềm.
 - D. Coagulase
4. Tổn thương nào do *staphylococci* gây ra ở thể mạn tính
 - A. Nhiễm trùng da
 - B. Viêm cơ tim.
 - C. Viêm tuỷ xương.
 - D. Viêm màng não.
5. Bệnh phẩm nào thường không được dùng để chẩn đoán nhiễm khuẩn do *staphylococci*.
 - A. Huyết thanh tìm kháng thể
 - B. Mủ.
 - C. Đờm
 - D. Phân
 - E. Chất nôn.
6. Trong môi trường thạch thường, dạng khuẩn lạc chủ yếu của *S.aureus*.
 - A. Dạng S, nhẵn, đường kính 1 - 2 mm.
 - B. Dạng S, đường kính 1 - 2 cm.
 - C. Dạng M, đường kính 1 - 2 mm.
 - D. Dạng R, đường kính 1- 2cm.

7. Tiêu chuẩn chẩn đoán xác định *S. aureus* là
- A. Kháng nguyên *S. aureus* (+).
 - B. Hình thể, sự sắp xếp, bắt màu gram.
 - C. Nuôi cấy trên thạch máu có hình ảnh tan máu hoàn toàn.
 - D. Trong môi trường canh thang làm đục môi trường và để lâu có lắng cặn.
 - E. Tìm kháng thể có trong huyết thanh.
8. Ngộ độc thực phẩm của *S. aureus* diễn biến
- A. Diễn biến cấp tính thường sau 2 - 8 giờ có triệu chứng lâm sàng.
 - B. Mạn tính
 - C. Ít có biểu hiện trên lâm sàng.
 - D. Thời gian ủ bệnh > 12 giờ.
9. Biện pháp phòng bệnh *Streptococcus*
- A. Phát hiện và điều trị kịp thời các tổn thương ở đường hô hấp và ngoài da do streptococcus
 - B. Vaccin.
 - C. Cách ly mầm bệnh.
 - D. Huyết thanh miễn dịch.
10. Tác nhân chính gây thấp khớp cấp là
- A. *S. pyogenes*
 - B. *S. agalactiae*.
 - C. *S. bovis*
 - D. *S. viridans*
11. Tiêu chuẩn đầu tiên để phân biệt *Staphylococcus* và *Streptococcus* là sử dụng test :
- A. Catalase
 - B. Oxydase.
 - C. Bacitracin.
 - D. Phosphatase kiềm.
 - D. Kháng optocin.
12. Tiêu chuẩn đầu tiên để phân biệt *Streptococcus* và *S. pneumoniae* dựa vào thử nghiệm
- A. Optochin.
 - B. Catalase
 - C. Oxidase
 - D. Lên men đường lactose

13. Phân biệt *N. meningitidis* và *N. gonorrhoeae* dựa vào thử nghiệm

- A. Maltose.
- B. Oxydase.
- C. Glucose
- D. Catalase

14. Loại vi khuẩn nào có khả năng gây nhiễm độc thức ăn

- A. *Staphylococcus aureus*
- B. *Streptococcus pyogenes*
- C. *Staphylococcus saprophyticus*
- D. *Staphylococcus epidermidis*
- E. *Streptococcus pneumoniae*

15. Lựa chọn đúng bệnh phẩm để chẩn đoán *N. gonorrhoeae*

- A. Máu làm phản ứng huyết thanh.
- B. Máu, mủ da, nước tiểu.
- C. Mủ đường sinh dục, nước tiểu, dịch ổ áp xe.
- D. Mủ đường sinh dục, nước tiểu, dử mắt.

Bài 6. TRỰC KHUẨN GÂY BỆNH

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày được đặc điểm sinh học của một số trực khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Trình bày khả năng gây bệnh của một số trực khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Mô tả được các phương pháp chẩn đoán, tiêu chuẩn chẩn đoán của một số trực khuẩn

*** Kỹ năng**

- Nhận định và phân tích được kết quả định danh 1 số trực khuẩn gây bệnh thường gặp trong 1 số bài tập tình huống.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập..

NỘI DUNG

1. Trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*)

1.1. Đặc điểm chung của trực khuẩn đường ruột

Họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*) bao gồm các trực khuẩn Gram âm, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện; có thể mọc được trên các môi trường nuôi cấy thông thường, không có enzym oxidase; lên enzym đường glucose có kèm theo sinh hơi hoặc không; khử nitrat thành nitrit; có thể di động hoặc không, nhưng nếu di động thì có nhiều lông ở xung quanh thân; không sinh nha bào.

Các thành viên của họ trực khuẩn đường ruột đứng đầu trong các căn nguyên vi khuẩn gây tiêu chảy. Ngoài đường tiêu hoá, các vi khuẩn đường ruột có thể gây bệnh ở nhiều cơ quan khác như tiết niệu, hô hấp, thần kinh... ở bất kỳ loại bệnh phẩm nào cũng có thể gặp thành viên của họ trực khuẩn đường ruột.

Enterobacteriaceae là họ vi khuẩn có rất nhiều thành viên giữ vị trí quan trọng trong vi sinh y học, bài này chỉ trình bày về một số vi khuẩn gây bệnh cho người thường gặp.

1.2. Trực khuẩn thương hàn (*Salmonella*)

1.2.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Salmonella là trực khuẩn Gram âm, có nhiều lông ở xung quanh thân.

Salmonella có 3 nhóm kháng nguyên: O, H và K. Kháng nguyên O gồm gần 70 yếu tố khác nhau. Hầu hết *Salmonella* có kháng nguyên H. Kháng nguyên K chỉ có ở *S. typhi* và *S. paratyphi C* và được gọi là kháng nguyên Vi (Virulence). Dựa vào cấu trúc kháng nguyên, *Salmonella* được chia thành các nhóm, các loài và các týp huyết thanh.

- Tính chất nuôi cấy

Hiệu kỵ khí tùy tiện, phát triển được trên các môi trường nuôi cấy thông thường. *Salmonella* không lên enzym lactose; lên enzym glucose, thường sinh hơi. oxidase (-), Catalase (+), H₂S (+), urease (-), Citrat Simmons (-), di động (+), lê.

- Sức đề kháng

Tiêu diệt ở 100 độ C / 5 phút

1.2.2. Khả năng gây bệnh

+ Bệnh thương hàn

Bệnh thương hàn do *S. typhi* và các *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* gây ra.

Vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể theo đường tiêu hoá do thức ăn, nước uống bị nhiễm bẩn, số lượng đủ để gây bệnh khoảng 10⁵ đến 10⁷. Sau khi vào ống tiêu hoá, vi khuẩn bám vào niêm mạc ruột non rồi xâm nhập qua niêm mạc vào các hạch mạc treo ruột. ở đây chúng nhân lên rồi qua hệ thống bạch huyết và ống ngực đi vào máu, lúc này các dấu hiệu lâm sàng bắt đầu xuất hiện. Từ máu, vi khuẩn đến lách và các cơ quan khác. Tới gan theo mật đổ xuống ruột rồi được đào thải qua phân. Tới thận, một số vi khuẩn được đào thải ra ngoài theo nước tiểu. Tới mảng peyer, vi khuẩn tiếp tục nhân lên.

Vi khuẩn thương hàn gây bệnh chủ yếu bằng nội độc tố. Nội độc tố kích thích thần kinh giao cảm ở ruột gây hoại tử chảy máu, vị trí tổn thương thường ở các mảng peyer. Có thể gặp biến chứng thủng ruột, thường do bệnh nhân ăn sớm khi chưa bình phục, nhất là các thức ăn cứng.

Nội độc tố theo máu lên kích thích trung tâm thần kinh thực vật ở não thất ba. Giai đoạn toàn phát thân nhiệt tăng cao, sốt "hình cao nguyên". Thân nhiệt tăng nhưng nhịp tim không tăng (mạch và nhiệt độ phân ly!). Bệnh nhân thường có dấu hiệu li bì, có thể hôn mê, truy tim mạch, tử vong.

Khoảng 5% bệnh nhân sau khi khỏi vẫn tiếp tục thải vi khuẩn qua phân do vi khuẩn vẫn tồn tại ở túi mật. Tình trạng này có thể kéo dài nhiều năm. Họ trở thành nguồn truyền bệnh rất nguy hiểm.

+ Nhiễm khuẩn và nhiễm độc thức ăn

Bệnh xảy ra do ăn phải thức ăn bị nhiễm *Salmonella*, thường do thức ăn không được bảo quản trong tủ lạnh. Các loài *Salmonella* gây nhiễm độc thức ăn, thường gặp ở nước ta, là *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*.

Thời gian ủ bệnh trung bình từ 10 đến 48 giờ. Sau thời gian ủ bệnh, bệnh nhân có sốt, nôn và ỉa chảy. Ở người lớn, rối loạn tiêu hoá thường kéo dài từ 2 đến 5 ngày rồi tự khỏi. Một số rất ít bệnh nhân trở thành người lành mang vi khuẩn, có thể kéo dài nhiều tháng.

Một số loài *Salmonella* chỉ gây nhiễm khuẩn nhiễm độc thức ăn ở người lớn lại có thể gây ra tình trạng bệnh lý rất nặng ở trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh như nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, viêm xương.

1.2.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: phân, chất nôn, máu

- Chẩn đoán trực tiếp

* Nhuộm soi trực tiếp từ bệnh phẩm

Nhuộm soi vi khuẩn từ phân ít có giá trị chẩn đoán. Nhuộm đếm bạch cầu đa nhân có giá trị định hướng chẩn đoán, mật độ khoảng 20 bạch cầu trên một vi trường (độ phóng đại x 400).

* Cây máu

Cấy máu được tiến hành lúc bệnh nhân đang sốt cao, cần lấy máu trước khi điều trị kháng sinh. Nếu chưa điều trị kháng sinh, ở tuần lễ đầu, tỷ lệ dương tính tới 90%, tuần thứ 2 khoảng 70 - 80%; tuần thứ 3 khoảng 40 - 60%. Cấy máu dương tính cho phép xác định chắc chắn bệnh nhân mắc bệnh thương hàn.

* Cây phân

Cấy phân có thể tiến hành vào bất kỳ giai đoạn nào của bệnh. Tuy nhiên chỉ riêng cấy phân dương tính không cho phép chẩn đoán chắc chắn, vì người lành cũng có thể mang vi khuẩn thương hàn.

Ngoài mục đích chẩn đoán, cấy phân còn có giá trị kiểm tra sau khi bệnh nhân đã hết các dấu hiệu lâm sàng có còn tiếp tục đào thải vi khuẩn nữa hay không và để phát hiện người lành mang vi khuẩn.

- Chẩn đoán gián tiếp

Tiến hành phản ứng Widal để xác định kháng thể trong huyết thanh. Phản ứng cần được làm 2 lần để xác định động lực kháng thể: lần đầu làm ở tuần thứ nhất, lần 2 làm ở tuần thứ 2 của bệnh. Nếu động lực kháng thể cao mới cho phép có chẩn đoán chắc chắn

1.2.4. Nguyên tắc phòng bệnh

Phương pháp không đặc hiệu

- Thực hiện vệ sinh ăn uống.
- Cung cấp và sử dụng nước sạch.
- Quản lý, xử lý phân.
- Phát hiện người lành mang vi khuẩn, đặc biệt lưu ý ở những người có liên quan trực tiếp đến ăn uống của tập thể.
- Chẩn đoán sớm, cách ly kịp thời, xử lý chất thải của bệnh nhân.

Phương pháp đặc hiệu

Vaccin phòng thương hàn đang được sử dụng chứa kháng nguyên Vi của *S. typhi*, đưa vào cơ thể bằng đường tiêm với 1 liều 25 μ g, có hiệu lực bảo vệ trên 70%.

Nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đang nghiên cứu Vaccin sống, giảm độc lực, đưa vào cơ thể bằng đường uống.

1.2.5. Nguyên tắc điều trị

Trước đây, chloramphenicol và ampicillin thường được dùng để điều trị *Salmonella*; chloramphenicol có hiệu lực gần như tuyệt đối trong điều trị các *Salmonella* nói chung và các *Salmonella* gây bệnh thương hàn nói riêng. Hiện nay, tỷ lệ *Salmonella* kháng thuốc ngày càng tăng. ở nước ta, những năm gần đây đã xuất hiện những vụ dịch thương hàn do vi khuẩn kháng thuốc gây nên.

1.3. Trực khuẩn lỵ (*Shigella*)

1.3.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể: *Shigella* là trực khuẩn mảnh, Gram âm, không có vỏ và không sinh nha bào.

Shigella đều có kháng nguyên thân O, một số có kháng nguyên K, tất cả đều không có kháng nguyên H. *Shigella* được chia thành 4 nhóm: A (*S. dysenteriae*), B (*S. flexneri*), C (*S. boydii*) và D (*S. sonnei*):

- *S. dysenteriae* có 10 týp huyết thanh, týp 1 còn có tên là trực khuẩn Shiga. *S. shiga* ngoài nội độc tố còn sinh ra một ngoại độc tố mạnh.
- *S. flexneri* có 6 týp huyết thanh.
- *S. boydii* có 15 týp huyết thanh.
- *S. sonnei* chỉ có 1 týp huyết thanh.
- Tính chất nuôi cấy

Shigella là vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện nhưng phát triển tốt trong điều kiện hiếu khí. *Shigella* lên enzym glucose, hầu hết không sinh hơi; không lên enzym lactose, trừ *S. sonnei* có khả năng lên enzym lactose chậm; H₂S (-), indol (-), Simmons (-),

urease (-).

- Sức đề kháng

Tiêu diệt ở 100 độ C/ 2 phút

1.3.2. Khả năng gây bệnh

Shigella là tác nhân gây bệnh lỵ trực khuẩn. Chỉ có người và khỉ mắc bệnh này. Bệnh rất hay gặp ở nước ta, có thể rải rác hoặc gây thành các vụ dịch địa phương.

Vi khuẩn theo thức ăn nước uống vào đường tiêu hoá, cũng có thể lây trực tiếp do bàn tay bẩn. Chỉ cần từ 10^2 đến 10^3 vi khuẩn đã có thể gây bệnh. *Shigella* gây tổn thương đại tràng nhờ khả năng xâm nhập và nội độc tố. Vi khuẩn bám rồi xâm nhập vào niêm mạc đại tràng. Chúng nhân lên nhanh chóng trong lớp niêm mạc. Vi khuẩn chết giải phóng ra nội độc tố gây xung huyết, xuất tiết, tạo thành những ổ loét và mảng hoại tử. Nội độc tố còn tác động lên thần kinh giao cảm gây co thắt và tăng nhu động ruột. Những tác động đó làm bệnh nhân đau bụng quặn, buồn đi ngoài và đi ngoài nhiều lần, phân có nhầy lẫn máu.

S. shiga và *S. smitzii* còn sinh ngoại độc tố có độc tính với thần kinh trung ương.

Bệnh lỵ trực khuẩn thường cấp tính. Một tỷ lệ nhỏ có thể trở thành mạn tính, những bệnh nhân này thỉnh thoảng lại bị ỉa chảy và thường xuyên thải vi khuẩn ra ngoài theo phân. ở nước ta, đa số trường hợp bị lỵ trực khuẩn do *S. dysenteriae* và *S. flexneri*.

1.3.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: phân

- Chẩn đoán trực tiếp

* Nhuộm soi trực tiếp

Bệnh phẩm có thể lấy sau khi bệnh nhân đã đi ngoài ra bô sạch, chỗ phân có nhầy lẫn máu, hoặc lấy trực tiếp từ trực tràng. Làm tiêu bản nhuộm soi xác định mật độ bạch cầu đa nhân, thường rất cao từ 30 đến 50, có khi trên 50 trong một vi trường (độ phóng đại x400).

* Cấy phân

Cấy phân là phương pháp tốt nhất để chẩn đoán bệnh lỵ trực khuẩn. Bệnh phẩm phải được cấy ngay vì vi khuẩn lỵ chết rất nhanh sau khi ra ngoài môi trường.

- Chẩn đoán gián tiếp

Phản ứng huyết thanh rất ít được làm để chẩn đoán bệnh lỵ trực khuẩn vì cho kết quả chậm và tính đặc hiệu không cao do *S. flexneri* (một căn nguyên chiếm tỷ lệ cao) có yếu tố kháng nguyên chung với một số vi khuẩn đường ruột khác.

1.4. *E. coli*

Escherichia do Escherich phát hiện lần đầu tiên năm 1885. Giống này gồm nhiều loài, trong đó, *E. coli* có vai trò quan trọng nhất.

1.4.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

E. coli là trực khuẩn Gram âm. Rất ít chủng *E. coli* có vỏ, nhưng hầu hết có lông.

E. coli có cả 3 nhóm kháng nguyên: Kháng nguyên O gồm gần 160 yếu tố; kháng nguyên K được chia thành 3 loại: A, B và L; kháng nguyên H gồm hơn 50 yếu tố.

Dựa vào cấu trúc kháng nguyên, *E. coli* được chia thành các týp huyết thanh. Với sự tổ hợp của các yếu tố kháng nguyên sẽ có rất nhiều týp huyết thanh khác nhau, mỗi týp huyết thanh được ký hiệu bằng kháng nguyên O và K, ví dụ O86B7.

Dựa vào tính chất gây bệnh, *E. coli* được chia thành các loại:

EPEC (Enteropathogenic *E. coli*): *E. coli* gây bệnh đường ruột.

ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*): *E. coli* sinh độc tố ruột.

EIEC (Enteroinvasive *E. coli*): *E. coli* xâm nhập đường ruột.

EAEC (Enteroadherent *E. coli*): *E. coli* bám dính đường ruột.

EHEC (Enterohaemorrhagic *E. coli*): *E. coli* gây chảy máu đường ruột.

- Tính chất nuôi cấy

Phát triển dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường; hiếu kỵ khí tùy tiện. Lên enzym nhiều loại đường và có sinh hơi; các *E. coli* đều lên enzym lactose và sinh hơi trừ EIEC; indol (+), H₂S (-), Simmons và urease (-).

- Sức đề kháng

Tiêu diệt ở 100 độ C / 5 phút

1.4.2. Khả năng gây bệnh

Trong đường tiêu hoá, *E. coli* chiếm khoảng 80% các vi khuẩn hiếu khí. Nhưng *E. coli* cũng là vi khuẩn gây bệnh quan trọng, nó đứng đầu trong các vi khuẩn gây ỉa chảy, viêm đường tiết niệu, viêm đường mật; đứng hàng đầu trong các căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết. *E. coli* có thể gây nhiều bệnh khác như viêm phổi, viêm màng não, nhiễm khuẩn vết thương.

Cơ chế gây bệnh của *E. coli* khác nhau tùy loại:

ETEC: gây bệnh do ngoại độc tố LT, là loại độc tố ruột giống độc tố ruột của *V. cholerae* (xem cơ chế gây bệnh của vi khuẩn tả).

EIEC: gây bệnh do khả năng xâm nhập vào niêm mạc đại tràng, cơ chế gây bệnh giống vi khuẩn lỵ.

EAEC: gây bệnh do bám vào niêm mạc và làm tổn thương chức năng ruột (Hình 53), cơ chế chưa thật sáng tỏ.

EHEC: cơ chế cũng chưa hoàn toàn rõ, nhưng người ta đã xác định được một loại độc tố có cấu trúc kháng nguyên và cơ chế tác động giống với ngoại độc tố của *S. shiga*. Trong quá trình gây bệnh, EHEC làm tổn thương xuất huyết ở ruột.

EPEC: cơ chế gây bệnh chưa được biết rõ.

1.4.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm : tùy vào tổn thương

- Chẩn đoán trực tiếp

Bệnh phẩm khác nhau tùy bệnh là phân với nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, nước tiểu với nhiễm khuẩn đường tiết niệu, máu nếu là nhiễm khuẩn máu.

Có thể làm tiêu bản soi trực tiếp đối với một số loại bệnh phẩm như cặn ly tâm nước tiểu hoặc nước não tủy. Phương pháp chẩn đoán chủ yếu nhất là nuôi cấy phân lập.

Đối với viêm màng não, hiện nay còn sử dụng kỹ thuật ngưng kết latex để xác định kháng nguyên của *E. coli* trong dịch não tủy.

- Chẩn đoán gián tiếp

Trên thực tế phương pháp chẩn đoán gián tiếp không được sử dụng để chẩn đoán các nhiễm khuẩn do *E. coli*.

1.5. *Klebsiella*

1.5.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

là các trực khuẩn Gram âm, có lớp vỏ dày gấp 2-3 lần tế bào.

- Tính chất nuôi cấy

Hiếu, kỵ khí tùy tiện

- Sức đề kháng

Tiêu diệt ở 100 độ C / 5 phút

1.5.2. Khả năng gây bệnh

Bệnh quan trọng nhất do *K. pneumoniae* gây ra là viêm phổi, thường gặp ở trẻ sơ sinh, tỷ lệ tử vong rất cao nếu không được điều trị sớm. Ngoài ra nó còn có khả năng gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu, viêm màng não, viêm tai giữa, viêm xoang.

1.5.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm : tùy vị trí tổn thương

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Phân lập vi khuẩn từ các bệnh phẩm

+ Nuôi cấy lên các môi trường thích hợp để phân lập và xác định vi khuẩn dựa vào hình thể, tính chất nuôi cấy đặc biệt (khuẩn lạc nhầy, dính), tính chất sinh vật hóa học, khả năng gây bệnh thực nghiệm. Xác định type bằng phản ứng ngưng kết hoặc phản ứng phình vỏ với kháng huyết thanh đặc hiệu type.

- Chẩn đoán gián tiếp

Thực hiện phản ứng huyết thanh tìm kháng thể tương ứng.

1.6. Proteus

1.6.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Proteus là các trực khuẩn Gram âm, có lông ở xung quanh thân và có khả năng di động

- Tính chất nuôi cấy

Trên môi trường đặc thường không tạo thành khuẩn lạc mà lan khắp bề mặt, nhiều khi trông như những lớp sóng đồng tâm. Tính chất này gây cản trở cho việc phân lập các vi khuẩn gây bệnh khác.

- Sức đề kháng

Tiêu diệt ở 100 độ C / 2- 5 phút

1.6.2. Khả năng gây bệnh

Chúng là vi khuẩn gây bệnh cơ hội, có thể gây viêm đường tiết niệu, viêm tai giữa, nhiễm khuẩn huyết, viêm mủ vết thương.

1.6.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: tùy vị trí tổn thương

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Phân lập vi khuẩn từ các bệnh phẩm

+ Nuôi cấy trên các môi trường thông thường. Xác định vi khuẩn dựa vào hình thái khuẩn lạc gọn sóng, mùi thối đặc biệt trên đĩa môi trường và trực khuẩn Gram âm urease dương tính và một số tính chất sinh vật hóa học khác.

+ Muốn phân lập thành khuẩn lạc riêng rẽ thì nuôi cấy trên môi trường có Natri desoxycholat, *Proteus* sẽ mọc thành khuẩn lạc riêng biệt có chấm đen ở giữa sau 48 giờ.

- Chẩn đoán gián tiếp

Thực hiện phản ứng huyết thanh tìm kháng thể tương ứng.

1.6.4. Nguyên tắc điều trị và phòng bệnh

- Điều trị: chloramphenicol, cephalosporin thế hệ 3,4; quinolon

- Phòng bệnh: vệ sinh an toàn thực phẩm; điều trị người lành mang bệnh; tiết trung

dụng cụ y tế;...

2. Haemophilus Influenzae

2.1. Đặc điểm sinh học

2.1.1. Hình thể

H. influenzae là trực khuẩn hoặc cầu trực khuẩn nhỏ, Gram âm. Kích thước 0,3-0,5 × 0,5-3 μm. Có thể gặp các dạng dài và mảnh như một đoạn chỉ khi điều kiện nuôi cấy không chuẩn. Không có lông, có thể có vỏ.

2.1.2. Tính chất nuôi cấy

H. influenzae là loại vi khuẩn khó nuôi cấy. Chúng không mọc trên các môi trường nuôi cấy thông thường, chỉ mọc khi trong môi trường đã có sẵn cả hai yếu tố X và V.

H. influenzae hiếu khí, mọc tốt hơn khi có CO₂ (3 - 5%) lúc mới phân lập. Mọc tốt trên môi trường chocolat và Levinthal trong khoảng nhiệt độ 23 - 39°C; tối ưu: 37°C. Không mọc được trên thạch máu cừu; nếu mọc được trên các loại thạch máu khác (ví dụ máu thỏ) thì không gây tan máu và khuẩn lạc nhỏ hơn nhiều so với trên thạch chocolat trong cùng các điều kiện nuôi cấy khác.

2.1.3. Sức đề kháng

H. influenzae chịu đựng rất kém với các yếu tố ngoại cảnh. Trong bệnh phẩm, chúng chết nhanh chóng nếu để ra ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, để khô hoặc lạnh. Các chất sát khuẩn thông thường tiêu diệt chúng một cách dễ dàng.

2.2. Khả năng gây bệnh

H. influenzae ký sinh bắt buộc trên niêm mạc đường hô hấp của người. Khoảng 75% trẻ lành có mang *H. influenzae* ở họng mũi (nasopharynx) như là một thành viên của vi khuẩn chí bình thường. ở người lớn, tỷ lệ này thấp hơn.

Bệnh do *H. influenzae* thường là thứ phát (sau sởi, cúm), gồm: viêm màng não, viêm đường hô hấp trên (thanh quản, tai giữa, xoang), viêm đường hô hấp dưới (viêm phế quản cấp và mạn tính, viêm phổi), nhiễm khuẩn huyết, viêm nội tâm mạc (hiếm), viêm niệu đạo và các nhiễm trùng sinh dục (âm đạo, cổ tử cung, tuyến Bartholin, vòi trứng).

Viêm màng não do *H. influenzae* là một bệnh nặng và có tính chất cấp tính, cần được chẩn đoán và điều trị tức khắc. ở những trẻ mà khả năng đề kháng giảm (suy dinh dưỡng, suy giảm miễn dịch, đang mắc các bệnh nặng khác), *H. influenzae* từ họng mũi xâm nhập vào máu, rồi theo đường máu đến màng não. Cũng có giả thuyết cho rằng, *H. influenzae* đến màng não bằng cách trực tiếp chui qua xoang sàng.

2.3. Chẩn đoán vi sinh

2.3.1. Bệnh phẩm: dịch đường hô hấp, dịch não tủy

2.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Nhuộm soi: lấy cấy ly tâm dịch não tủy nhuộm có thể thấy các cầu trực khuẩn Gram âm, to nhỏ không đều, bắt màu mờ nhạt trên vi trường có nhiều bạch cầu đa nhân; rải rác có các vi khuẩn rất dài và mảnh. Tính chất đa hình thái như vậy là một dấu hiệu tốt để nghĩ tới *H. influenzae*.

Tìm kháng nguyên vỏ týp b trong bệnh phẩm: để chẩn đoán nhanh các nhiễm trùng do *H. influenzae* týp b gây ra, ngày nay, người ta dùng kỹ thuật miễn dịch để phát hiện kháng nguyên týp b trong dịch não tủy, máu và nước tiểu. Các phương pháp miễn dịch được áp dụng là miễn dịch điện di đối lưu, ngưng kết thụ động, đồng ngưng kết và ELISA với kháng thể đơn dòng.

Tìm ADN: dùng một đoạn ADN mẫu đánh dấu phóng xạ hoặc dùng kỹ thuật nhân gen PCR (polymerase chain reaction) để tìm đoạn ADN đặc trưng của *H. influenzae* trong bệnh phẩm.

Nuôi cấy: Nếu bệnh phẩm không bội nhiễm (các loại dịch trong các khoang kín, máu) thì dùng thạch chocolat thường. Nếu bệnh phẩm bội nhiễm (đờm, nhày họng, dịch hút khí quản) thì dùng thạch chocolat có bacitracin (300 µg/ml) để ức chế các tạp khuẩn. Để các môi trường đã nuôi cấy vào khí trường 3-5% CO₂ ở 37°C.

Xác định vi khuẩn dựa vào:

- Nhu yếu: dùng kỹ thuật “vệ tinh”, khoanh giấy (X, V) và porphyrin.

2.3.3. Chẩn đoán gián tiếp

- Kháng huyết thanh: dùng phản ứng ngưng kết trên phiến kính hoặc phản ứng phình vỏ với kháng huyết thanh mẫu (từ a đến f). Đương nhiên, những chủng không có vỏ thì không dùng được phương pháp này.

- Định týp sinh học. Týp sinh học có giá trị về dịch tế học; trong viêm màng não, hơn 90% số chủng thuộc về týp I. Kỹ thuật này có thể áp dụng cho tất cả các chủng có vỏ hoặc không có vỏ.

2.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

- Phòng không đặc hiệu:

Viêm màng não do *H. influenzae* týp b là một bệnh lây theo đường hô hấp. Bệnh nhân phải được cách ly. Người lành tiếp xúc với người bệnh phải uống kháng sinh dự phòng.

- Phòng đặc hiệu:

Vaccin thế hệ thứ nhất: được tinh chế từ vỏ polysaccharid của *H. influenzae* týp b. Đáp ứng miễn dịch đối với Vaccin này thì tốt ở nhóm trẻ trên hai tuổi nhưng rất kém ở nhóm dưới hai tuổi, nhóm mà nguy cơ mắc bệnh cao nhất.

Vaccin thế hệ thứ hai: nhược điểm của Vaccin thế hệ thứ nhất là tính sinh miễn dịch kém; vì vậy, hiện nay người ta đã gắn kháng nguyên này vào một protein mang (carrier protein) tạo nên một hỗn hợp, trong đó protein mang hoạt động như một tá chất. Vì vậy, tính sinh miễn dịch của polysaccharid được tăng cường và Vaccin này đã được chứng minh là gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn Vaccin thế hệ thứ nhất trên trẻ nhỏ.

Năm 1968, lần đầu tiên, một trường hợp viêm màng não mủ do *H. influenzae* điều trị bằng ampicillin bị thất bại. Năm 1974, những chủng kháng ampicillin do sinh ra enzym β -lactamase đã thật sự được chứng minh.

H. influenzae kháng chloramphenicol nhờ enzym chloramphenicol acetyltransferase (CAT). enzym này xúc tác quá trình chuyển hai nhóm acetyl từ coenzym A tới những vị trí hoạt động của phân tử chloramphenicol; nhờ vậy, tính chất ức chế tổng hợp protein của chloramphenicol bị mất đi.

Vì các lý do nêu trên, điều trị các nhiễm trùng do *H. influenzae* gây ra phải dựa vào kháng sinh đồ. Trong khi chưa có kết quả kháng sinh đồ hoặc khi không phân lập được vi khuẩn, hiện nay, người ta ưu tiên lựa chọn ampicillin và/hoặc chloramphenicol. Dùng cephalosporin thế hệ thứ 3 (ví dụ, cefotaxime) cũng cho kết quả rất tốt.

3. Trực khuẩn mủ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*)

3.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Trực khuẩn mủ xanh Gram âm, thẳng hoặc hơi cong nhưng không xoắn, hai đầu tròn. Kích thước từ 0,5-1,0 μm \times 1,5-5,0 μm . Có một lông duy nhất ở một cực. Các pili của trực khuẩn mủ xanh dài khoảng 6 nm, là nơi tiếp nhận nhiều loại phage và giúp cho vi khuẩn gắn vào bề mặt của tế bào vật chủ. Trực khuẩn mủ xanh không sinh nha bào.

- Tính chất nuôi cấy

Trực khuẩn mủ xanh mọc dễ trên các môi trường nuôi cấy thông thường (thạch thường, thạch máu, canh thang), hiếu khí tuyệt đối. Nhiệt độ tối ưu là 37°C, nhưng chúng có thể mọc được trong khoảng dao động rộng (5 - 42°C); pH thích hợp từ 7,2 - 7,5 (dao động 4,5 - 9,0).

Trên môi trường đặc, có thể gặp hai loại khuẩn lạc: một loại to, nhẵn, bờ trái

đet, giữa lõi lên trông giống như quả trứng ốp (fried egg); một loại khác thì xù xì; cũng có khi gặp loại thứ ba, khuẩn lạc nhầy. Trong các bệnh phẩm lâm sàng, thường gặp loại thứ nhất; trong các mẫu lấy từ môi trường, thường gặp loại thứ hai. Tính chất đặc trưng của trực khuẩn mũ xanh là sinh sắc tố và chất thơm. Có hai loại sắc tố chính:

- Pyocyanin: có màu xanh lá cây, tan trong nước và chloroform, khuếch tán tốt ra môi trường nuôi cấy, làm cho môi trường và khuẩn lạc có màu xanh nên có thể nhận ra nó một cách dễ dàng bằng mắt thường. Pyocyanin thuộc loại sắc tố phenazin, cấu trúc hoá học của nó đã được phân tích chi tiết. Chính sắc tố này đã làm cho mũ có màu xanh.

- Pyoverdins: là loại sắc tố huỳnh quang, phát màu xanh khi chiếu tia cực tím có bước sóng 400 nm. Pyoverdins không bền vững, dễ mất đi trong điều kiện nuôi cấy không chuẩn. Khi nuôi cấy vi khuẩn ở môi trường có nồng độ sắt thấp, nó được tổng hợp nhiều hơn. Cấu trúc hoá học của pyoverdins chưa được biết đầy đủ.

- Sức đề kháng

Trực khuẩn mũ xanh chết nhanh chóng ở 100°C. Trong môi trường ẩm, thoáng và không có ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, chúng sống được hàng tuần; trong môi trường có dinh dưỡng tối thiểu; ở 5°C, chúng sống được hơn 6 tháng.

3.2. Khả năng gây bệnh

Trực khuẩn mũ xanh có một số yếu tố độc lực là nội độc tố, ngoại độc tố và một số enzym.

Trực khuẩn mũ xanh là loại vi khuẩn gây bệnh có điều kiện. Khi cơ thể bị suy giảm miễn dịch (tự nhiên hoặc mắc phải), bị mắc các bệnh ác tính hoặc mạn tính, dùng lâu dài corticoid, kháng sinh hoặc các chất chống ung thư thì dễ mắc bệnh nhiễm trùng nội sinh hoặc ngoại sinh do trực khuẩn mũ xanh.

Người ta đã tìm thấy trực khuẩn mũ xanh ở khắp nơi trong bệnh viện: đầu các ống thông, máy khí dung, máy hô hấp nhân tạo, máy hút ẩm, bình chứa nước, vòi nước máy, thậm chí trong cả một số dung dịch vẫn dùng để rửa vết thương do pha chế hoặc bảo quản không tốt. Trực khuẩn mũ xanh cùng với tụ cầu vàng là hai vi khuẩn thường gặp nhất trong nhiễm trùng bệnh viện.

Trực khuẩn mũ xanh từ môi trường bên ngoài xâm nhập vào cơ thể qua các vết thương hở (nhất là bỏng). Tại chỗ xâm nhập, chúng gây viêm có mũ (điển hình, mũ có màu xanh); nếu cơ thể suy giảm sức đề kháng, chúng có thể xâm nhập vào và gây viêm các phủ tạng (xương, đường tiết niệu, tai giữa, phế quản, màng não) hoặc gây bệnh toàn thân (nhiễm khuẩn huyết, viêm nội tâm mạc). Về bệnh sinh học, có

giả thuyết cho rằng, các sản phẩm ngoại tiết như sắc tố, độc tố tan máu, độc tố ruột, ngoại độc tố A (độc tố gây chết) có vai trò chính.

3.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: lấy từ ổ kín (ổ mũ chưa vỡ, dịch màng phổi, dịch màng não), lấy từ những vùng tạp nhiễm (ổ mũ đã vỡ, đờm, nhầy họng) hoặc từ máu

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Nhuộm Gram thường ít có ý nghĩa cho chẩn đoán. Tuy nhiên, trên tiêu bản có thể thấy: trực khuẩn nhỏ, mảnh, Gram âm. Tuy nhiên, đây chỉ có ý nghĩa định hướng cho các bước phân lập tiếp theo với trực khuẩn mũ xanh.

+ Nuôi cấy trực tiếp vào môi trường, để các môi trường đã cấy bệnh phẩm ở 37°C trong khí trường thường.

Chọn các khuẩn lạc màu xanh và nhuộm xanh môi trường để làm các thử nghiệm xác định vi khuẩn. Trong thực hành bệnh viện, nếu những khuẩn lạc như trên là trực khuẩn Gram âm không sinh nha bào, oxidase (+), chuyển hoá đường theo kiểu oxy hoá thì được coi là trực khuẩn mũ xanh.

Có khoảng 10% số chủng trực khuẩn mũ xanh không sinh sắc tố; trong những trường hợp này, chẩn đoán vi khuẩn học gặp nhiều khó khăn. Người phải dùng các môi trường tăng sinh sắc tố: môi trường King A (tăng sinh pyocyanin) và môi trường King B (tăng sinh pyoverdins).

- Chẩn đoán gián tiếp

Thực hiện phản ứng huyết thanh tìm kháng thể tương ứng.

3.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu đóng vai trò chính trong việc ngăn ngừa nhiễm trực khuẩn mũ xanh. Giữ gìn vệ sinh chung, triệt để thực hiện các quy trình tiệt trùng, làm đúng các thao tác vô trùng để tránh lây chéo trong bệnh viện. Đối với cá nhân: giữ gìn vệ sinh, tránh sây sát da và niêm mạc, tăng cường sức đề kháng chung, tránh lạm dụng kháng sinh và các thuốc gây suy giảm miễn dịch.

Trực khuẩn mũ xanh kháng lại nhiều kháng sinh thông dụng (penicillin, ampicillin, chloramphenicol và tetracyclin), nhất là những chủng gây nhiễm trùng bệnh viện. Người ta thường dùng aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin) hoặc cephalosporin thế hệ 3 (ví dụ, ceftazidime) hoặc imipenem để điều trị các nhiễm trùng do trực khuẩn mũ xanh.

4. Helicobacter pylori

4.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

H. pylori là vi khuẩn hình xoắn, hơi cong, Gram âm, đường kính từ 0,3 - 1,0, dài 1,5 - 5 μm . *H. pylori* di động trong môi trường lỏng nhờ một chùm lông ở một đầu, thông thường chúng có từ 2 đến 6 lông.

- Tính chất nuôi cấy

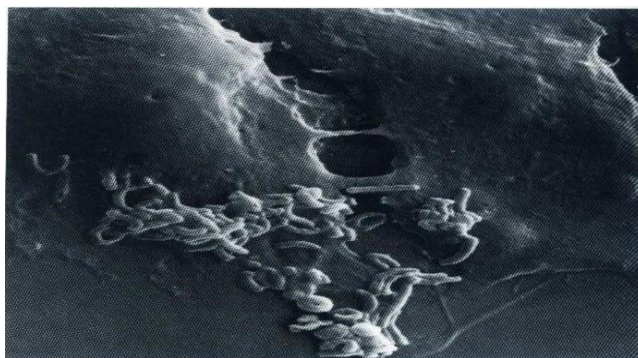
H. pylori là loài vi khuẩn rất khó nuôi cấy. Khi nuôi cấy, cần môi trường giàu chất dinh dưỡng và một số yếu tố đặc biệt. Bên cạnh môi trường chọn lọc đặc hiệu, *H. pylori* rất cần khí trường thích hợp như 5% O_2 , 7% CO_2 , 8% H_2 , 70% N_2 và 10% các khí khác. Nhiệt độ thích hợp 37°C. Khuẩn lạc của *H. pylori* trên môi trường đặc thì trong hoặc xám nhạt, đôi khi gây tan máu, đường kính của khuẩn lạc khoảng 1 mm, xuất hiện sau 48 - 72 giờ.

- Sức đề kháng

H. pylori có khả năng sống lâu ở môi trường có độ acid cao của dạ dày nhưng không phải là vi khuẩn ưa acid như một số quan niệm trước đây. Lý do là *H. pylori* có khả năng bài tiết urease rất mạnh, nó phân giải urê trong dạ dày tạo thành amoniac bao quanh vi khuẩn, khiến cho chúng có thể chịu đựng được môi trường acid của dạ dày.

4.2. Khả năng gây bệnh

HP có thể gây viêm, loét và ung thư dạ dày.



Hình 10.3. *H. pylori* trong niêm mạc dạ dày

H. pylori có khả năng tiết urease mạnh, enzym này có hoạt tính rất mạnh phân giải urê thành amoniac. Urê là sản phẩm chuyển hoá của các mô tế bào, chúng vào máu một phần và được đào thải ra ngoài qua thận. Một lượng urê tương đương từ máu qua lớp niêm mạc dạ dày vào dịch dạ dày. Amoniac có phản ứng kiềm, tạo thành một lớp đệm bao quanh *H. pylori*, giúp cho chúng tránh được môi trường acid cao của dạ dày. Mặt khác, amoniac sinh ra cũng gây độc trực tiếp đối với tế bào niêm mạc dạ dày. Các enzym catalase, lipase và glycoproteinase của *H. pylori* phân giải chất nhầy giúp cho chúng xâm nhập vào niêm mạc sâu hơn và phơi bày các thụ thể tế bào cho các adhesin của *H. pylori* gắn vào đó và dần dần phá huỷ tế bào. *H. pylori* còn tiết ra các độc tố tế bào, các độc tố này cũng gây độc và phá huỷ tế bào.

Gần đây, người ta phát hiện thấy kháng nguyên CagA làm tăng tiết interleukin-

8, có giả thuyết cho rằng yếu tố này cũng là một trong các yếu tố làm bệnh tiến triển đến ung thư.

4.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: là mảnh sinh thiết từ nơi viêm hoặc ổ loét dạ dày-tá tràng.
- Chẩn đoán trực tiếp
 - + Nhuộm soi: có thể nhuộm Gram để quan sát Hình thể của *H. pylori*.
 - + Nuôi cấy: môi trường để nuôi cấy *H. pylori* có rất nhiều loại, tùy theo kinh nghiệm của từng phòng thí nghiệm mà sử dụng các môi trường khác nhau, như môi trường Pylori-agar, Skirrow's cải tiến, Columbia, Brucella hoặc BHI-agar có thêm 7-10% máu ngựa, ủ ở 37°C với 10% CO₂ và độ ẩm thích hợp.
 - + Xác định enzym urease có ở mảnh sinh thiết: đây là kỹ thuật cho kết quả nhanh, chẩn đoán sơ bộ xem có mặt của *H. pylori* trong bệnh phẩm hay không (kỹ thuật CLO-test).
 - + Có thể xác định urê qua hơi thở: người ta sử dụng sự hiện diện của enzym urease trong trường hợp niêm mạc dạ dày bị nhiễm *H. pylori*, thông qua việc gắn chất đồng vị phóng xạ ¹⁴C vào dạ dày, nếu có enzym urease thì sẽ nhanh chóng phân giải urê ¹⁴C thành amoniac và dioxit phóng xạ ¹⁴C. Dioxit carbon phóng xạ này sẽ nhanh chóng đi vào máu và tới phổi và có thể phát hiện được chúng qua hơi thở của bệnh nhân.

Kỹ thuật nhân gen PCR (polymerase chain reaction): đây là kỹ thuật có thể phát hiện được các đoạn gen đặc hiệu của *H. pylori* ở cả mảnh sinh thiết dạ dày, dịch dạ dày, nước bọt và phân của bệnh nhân.

- Chẩn đoán gián tiếp
 - + Xác định kháng thể đặc hiệu IgG hoặc IgA trong huyết thanh bệnh nhân. Phương pháp này rất có ích trong nghiên cứu dịch tễ học.

4.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

5. Phẩy khuẩn tả (Vibrio cholera)

Được R. Koch phân lập lần đầu tiên 1883. *V. cholerae* là một loài bao gồm các vi khuẩn gây bệnh tả và cả những vi khuẩn không gây bệnh tả có sự giống nhau về cấu trúc của ADN, và có sự giống nhau cơ bản về các tính chất sinh vật học khác.

5.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể
 - V. cholerae* là loại vi khuẩn hình que hơi cong, Gram âm, không có vỏ, không sinh nha bào, có một lông ở đầu và có khả năng di động rất mạnh.
- Tính chất nuôi cấy

Hiếu khí, có thể phát triển tốt trong môi trường kiềm (pH 8,5-9,5) và nồng độ NaCl cao (3%). Các tính chất hoá sinh: oxidase (+), indol (+), glucose (+), sucrose (+), manose (+), lactose (-), arabinose (-), H₂S (-), urease (-).

- Sức đề kháng

V. cholerae có sức đề kháng yếu với các tác nhân lý hoá, trừ pH kiềm; tuy nhiên có thể sống một số giờ trong phân và một số ngày trong nước.

5.2. Khả năng gây bệnh

Trong điều kiện tự nhiên, vi khuẩn tả chỉ gây bệnh cho người.

Vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể bằng đường ăn uống. Để xuống ruột non, vi khuẩn phải vượt qua dạ dày. Bình thường độ pH của dạ dày xấp xỉ 3, đủ gây chết nhanh chóng vi khuẩn tả. Những thử nghiệm trên động vật và trên người tình nguyện cho thấy rằng, vi khuẩn tả chỉ gây được ỉa chảy cấp nếu cho động vật thí nghiệm hoặc người tình nguyện uống natri bicarbonat ngay trước khi cho uống vi khuẩn tả. Trên thực tế, bệnh tả thường gặp ở những người có độ acid của dịch vị bị giảm hoặc mất. Đối với những người dạ dày tiết dịch bình thường thì thức ăn, nước uống phải có khả năng trung hoà bớt acid của dịch vị, vi khuẩn tả mới có thể gây bệnh được.

Sau khi vượt qua dạ dày xuống ruột non, vi khuẩn tả bám vào niêm mạc nhưng không xâm nhập sâu vào mô ruột và hầu như không gây tổn thương cấu trúc của niêm mạc ruột. Tại ruột non, vi khuẩn phát triển nhanh chóng nhờ pH thích hợp, tiết ra độc tố ruột LT (thermolabile toxin - trước kia gọi là cholergen). Độc tố ruột gắn vào niêm mạc ruột non làm cho tế bào niêm mạc ruột giảm hấp thụ Na⁺, tăng tiết nước và Cl⁻ gây ra ỉa chảy cấp tính (Hình 64). Nếu không được điều trị tích cực bệnh nhân sẽ chết vì kiệt nước và mất các chất điện giải.

5.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: phân và chất nôn, cần phải xét nghiệm trong vòng 2 giờ, nếu muộn hơn thì phải cấy vào môi trường bảo quản.

- Chẩn đoán trực tiếp

* Nhuộm soi hoặc soi tươi

Tiến hành soi tươi, quan sát tính di động của vi khuẩn tả. Nhuộm soi, đếm bạch cầu trong phân: trong bệnh tả thường thấy số lượng rất ít, khoảng 5 bạch cầu trong một vi trường (độ phóng đại x400).

* Kỹ thuật kháng thể huỳnh quang trực tiếp

Phương pháp này cho kết quả rất nhanh và có tính đặc hiệu cao, thường được áp dụng trong kiểm dịch ở các cửa khẩu.

* Nuôi cấy phân lập

Các môi trường thường được dùng để phân lập vi khuẩn tả là: pepton kiềm, thạch kiềm, TCBS. Hình 65 giới thiệu sơ đồ phân lập và xác định vi khuẩn tả.

- Chẩn đoán gián tiếp

Trên thực tế không làm chẩn đoán huyết thanh vì cho kết quả chậm.

5.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu

Những biện pháp quan trọng là: vệ sinh ăn uống, sử dụng nước sạch, diệt ruồi; chẩn đoán sớm, cách ly bệnh nhân, xử lý phân và chất nôn của bệnh nhân. Khi có dịch tả, phải thông báo ngay và kịp thời thực hiện các biện pháp bao vây dập dịch.

Phòng bệnh đặc hiệu

Hiện nay có 2 loại Vaccin sử dụng theo đường uống: Vaccin sống giảm độc lực và Vaccin chết. Một số nghiên cứu cho thấy Vaccin sống có khả năng tạo miễn dịch bảo vệ trên 80%, tương đương với tỷ lệ bảo vệ ở nhóm người đã bị mắc bệnh tả thể nhẹ.

Vaccin phòng bệnh tả đang được dùng ở nước ta là Vaccin bất hoạt gồm cả O1 và O139, đưa vào cơ thể theo đường uống. Đối tượng sử dụng là những người sống trong vùng có dịch tả lưu hành, ở mọi lứa tuổi.

Nguyên tắc điều trị

Bù nước và điện giải có tầm quan trọng hàng đầu để cứu sống bệnh nhân.

Vi khuẩn tả còn nhạy cảm với nhiều kháng sinh thông thường. Để điều trị bệnh tả thường dùng tetracyclin, chloramphenicol hoặc bactrim. Tuy nhiên cũng đã có tài liệu công bố phát hiện được vi khuẩn tả kháng thuốc.

6. Trực khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*)

6.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

TKBH có hình dạng giống các *Corynebacterium* khác. Kích thước của chúng khoảng 0,5-1 x 2-8 μm , Gram dương; luôn có hạt nhiễm sắc, đó là các không bào chứa polime của polyphosphoric. Trên môi trường nuôi cấy, TKBH thường đa hình thái (hình chùy, hình vọt). Khi nhuộm trực tiếp từ bệnh phẩm, TKBH thường có hạt nhiễm sắc và đứng thành từng đám như chữ nho

-Tính chất nuôi cấy

TKBH thuộc loại khó nuôi cấy. Chúng phát triển tốt trên môi trường có máu hoặc huyết thanh. Trên môi trường huyết thanh đông (Loffler), TKBH phát triển rất nhanh, tạo nên khuẩn lạc xám và dẹt. Hiện nay người ta thay môi trường này bằng môi trường trứng, TKBH mọc sau nuôi cấy qua đêm, nhưng không rõ khuẩn lạc. Môi

trường trứng kinh tế và dễ sản xuất hơn. Trên môi trường thạch máu có tellurit kali (môi trường Schroer), TKBH tạo thành khuẩn lạc màu đen sau cấy 48 giờ.

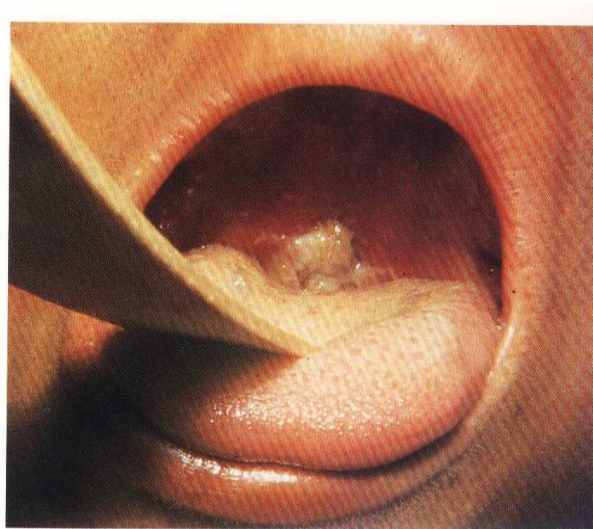
- Sức đề kháng

TKBH thuộc loại vi khuẩn có khả năng đề kháng khá tốt. Chúng ít nhạy cảm với ánh sáng và nhiệt độ. Chúng đề kháng với sulfamid, nhưng nhạy cảm với penicillin và kháng sinh có hoạt phổ rộng. TKBH có thể tồn tại ở đồ chơi và quần áo từ một đến vài tuần.

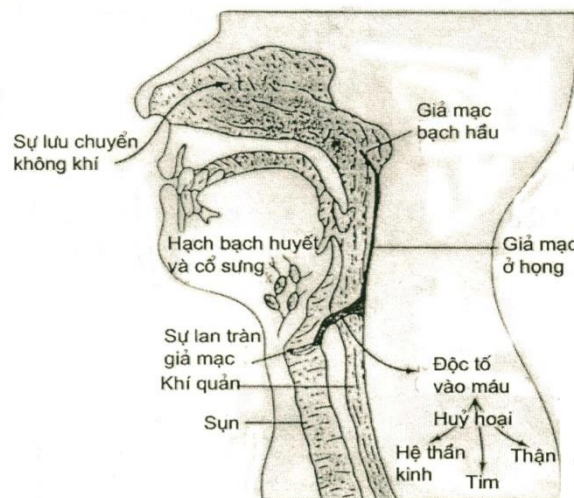
6.2. Khả năng gây bệnh

Đường xâm nhập: TKBH lây lan theo đường thở và xâm nhập vào cơ thể bằng các giọt nước bọt, có thể qua đồ chơi của trẻ em.

Nơi cư trú: TKBH thường ký sinh ở phần trên của đường hô hấp, mà thường gặp nhất là vùng hầu họng. Chúng tạo nên các màng giả ở đây.



Hình 14.2. Màng giả trong bệnh bạch hầu



Hình 14.3. Cơ chế gây bệnh bạch hầu

ở một số nước trên thế giới, TKBH có thể xâm nhập vào niêm mạc mắt, âm

đạo và da (nơi bị tổn thương) và tạo nên màng giả bạch hầu.

- Tính chất màng giả bạch hầu: màu trắng xám, dai, khó bóc và khi bóc hay chảy máu. Màng giả được tạo thành do fibrin và tế bào viêm. TKBH sống ở đây và tiết ra ngoại độc tố, ngoại độc tố thấm vào máu và tác động tới toàn thân. Màng giả bạch hầu có thể lan xuống thanh khí quản gây bí tắc hô hấp.

- Ngoại độc tố bạch hầu: là những glycoprotein, trọng lượng phân tử 60.000 dalton. Nó gồm 2 phần: phần B (binding) bám vào màng tế bào cảm thụ, giúp phần tử A (active, mang hoạt tính enzym) chui vào tế bào ngăn cản sự sinh tổng hợp protein của tế bào, gây nên nhiễm độc toàn thân. Phần A đã ngăn cản giải phóng các ARN vận chuyển, sau khi nó đã đưa các acid amin đến các polyribosom, nên sự tổng hợp protein bị ngăn cản.

- Các cơ quan bị tổn thương nặng do ngoại độc tố bạch hầu là tim (nên thường gây biến chứng tim và người bệnh chết), thần kinh ngoại biên (nên có biến chứng liệt), tuyến thượng thận và gan.

6.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: là màng giả bạch hầu, hoặc ngoáy họng bằng tăm bông vô trùng khi người bệnh có biểu hiện nhiễm trùng, nhiễm độc.

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Nhuộm trực tiếp: Thường nhuộm 2 tiêu bản, 1 xanh methylen kiềm (hoặc Albert hay Neisser) để xem hạt nhiễm sắc của TKBH. Xanh methylen kiềm là phương pháp nhuộm đơn giản và kinh tế hơn nhuộm Albert hay Neisser. Một tiêu bản nhuộm Gram để xem các vi khuẩn khác. Nếu thấy trực khuẩn hình chùy có hạt nhiễm sắc thì rất có ý nghĩa với chẩn đoán bạch hầu.

Chú ý: Những dấu hiệu để chẩn đoán sớm BH: Người bệnh có biểu hiện nhiễm trùng, nhiễm độc, có màng giả và nhuộm thấy hình thể TKBH.

Trong 4 đường cấy vi khuẩn, có 2 đường giữa là hai chủng *C. diphtheriae* có ngoại độc tố: xuất hiện các đường tua trắng giữa miếng giấy tẩm SAD (nằm ngang) và đường cấy vi khuẩn (thẳng đứng)

+ Nuôi cấy: thường cấy trên môi trường trứng và Schroer. Trên môi trường trứng TKBH mọc sau 18 giờ, nhưng không tạo thành khuẩn lạc. Để xác định TKBH người ta phải nhuộm mù 3 điểm trên bề mặt môi trường. Còn môi trường Schroer là môi trường chọn lọc, nên việc nhận biết khuẩn lạc TKBH dễ hơn. Đó là những khuẩn lạc có màu đen và dạng S (nếu là *C. mitis*) hoặc dạng R (nếu là *C. gravis*).

- Chẩn đoán gián tiếp

+ Xác định độc tố: để kháng định TKBH độc lực cần xác định được ngoại độc tố của chúng bằng phản ứng Elek (Hình 67) hoặc phản ứng trung hòa trong da thỏ hay chuột lang. Xác định ngoại độc tố rất cần thiết ở trường hợp dịch tản phát hoặc ngoài dịch bạch hầu.

6.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Quan trọng nhất là tiêm vaccin phòng bệnh bạch hầu cho trẻ theo chương trình tiêm chủng mở rộng. Đây là vaccin ở dạng phối hợp với uốn ván và ho gà. Nếu có dịch bạch hầu xảy ra, phải bao vây dập tắt ổ dịch, dùng kháng sinh cho người ở vùng có dịch lưu hành, vệ sinh tẩy uế môi trường.

Điều trị bệnh bạch hầu cần phải tập trung giải quyết các vấn đề sau đây:

- Chống nhiễm độc bằng huyết thanh kháng bạch hầu (Serum Anti Diphtheriae, SAD).
- Chống khó thở tùy theo mức độ mà cho thở oxy qua sonde hoặc mở khí quản và cho thở máy.
- Chống suy tim bằng thuốc trợ tim nhóm digitalis.
- Chống nhiễm khuẩn và nâng cao thể trạng.

7. Trực khuẩn Lao (*Mycobacterium tuberculosis*)

7.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Vi khuẩn lao là những trực khuẩn mảnh, kích thước khoảng 0,5 x 2-5 μm . Chúng không có vỏ, không có lông và không có nha bào. Trong bệnh phẩm, trực khuẩn lao thường đứng thành từng đám nối đầu vào nhau. Nhuộm Ziehl-Neelsen, vi khuẩn có màu đỏ.

- Tính chất nuôi cấy

Trực khuẩn lao thuộc loại hiếu khí. Chúng phát triển rất chậm, thường 1-2 tháng mới tạo được khuẩn lạc trên môi trường. Trên môi trường đặc Loewenstein (gồm chủ yếu khoai tây, huyết thanh và asparagin), trực khuẩn lao mọc thành khuẩn lạc dạng R. Trong môi trường lỏng Sauton (là môi trường tổng hợp), trực khuẩn lao mọc thành vầng và lắng cặn.

- Sức đề kháng

Trực khuẩn lao thuộc loại hiếu khí. Chúng phát triển rất chậm, thường 1-2 tháng mới tạo được khuẩn lạc trên môi trường. Trên môi trường đặc Loewenstein (gồm chủ yếu khoai tây, huyết thanh và asparagin), trực khuẩn lao mọc thành khuẩn lạc dạng R. Trong môi trường lỏng Sauton (là môi trường tổng hợp), trực khuẩn lao mọc thành vầng và lắng cặn.

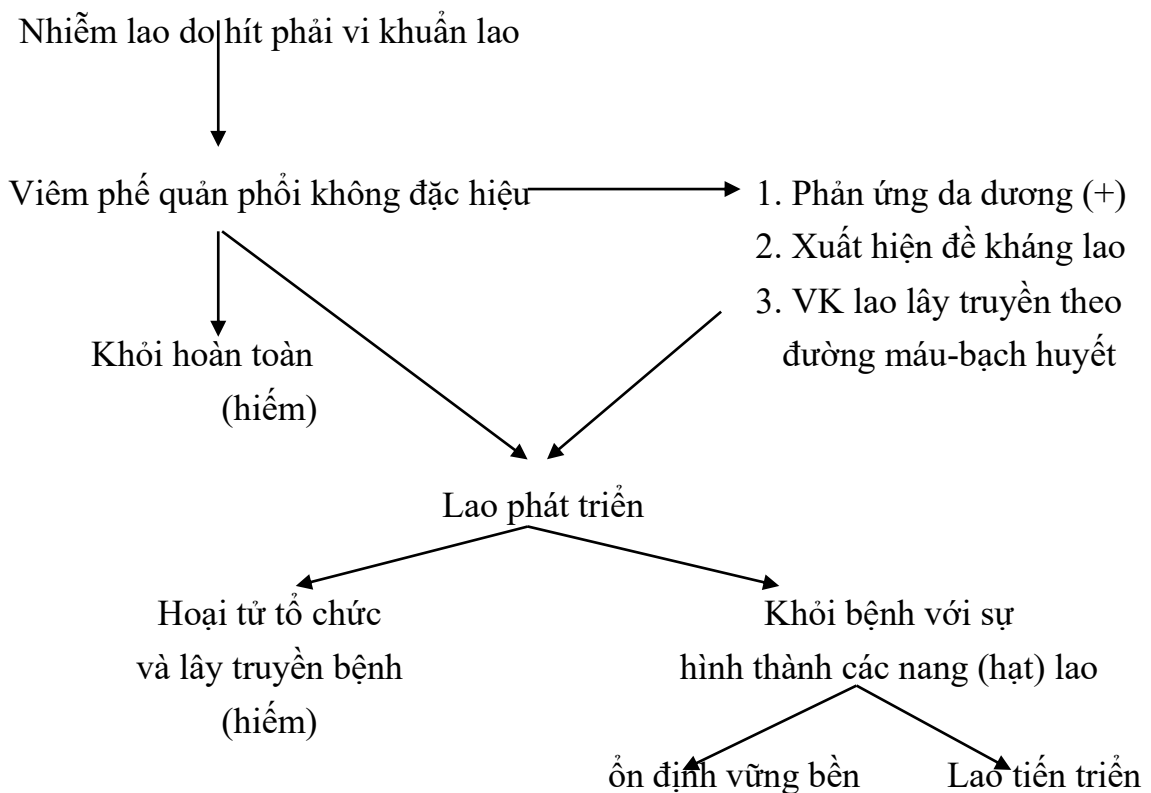
7.2. Khả năng gây bệnh

- Trực khuẩn lao thường xâm nhập theo đường thở qua các giọt nước bọt và gây nên lao phổi (90% tổng số lao). Chúng vẫn có thể xâm nhập vào đường tiêu hóa (qua sữa bò tươi) và gây nên lao dạ dày, ruột. Lao hạch gặp nhiều thứ 2 sau lao phổi.

- Nhiễm vi khuẩn lao lần đầu gọi là lao sơ nhiễm. Khoảng 90% lao sơ nhiễm sẽ qua khỏi và để lại miễn dịch với vi khuẩn lao. Từ 5-15% lao sơ nhiễm phát triển thành lao bệnh, do không được điều trị và khả năng đề kháng suy giảm, hoặc sau khi bị lao sơ nhiễm một số năm họ bị bệnh lao.

- Từ các cơ quan bị lao ban đầu (phổi, đường ruột...), trực khuẩn lao theo đường máu và bạch huyết đến tất cả các cơ quan và gây lao ở các bộ phận khác nhau của cơ thể (lao hạch, lao màng não, lao thận, lao xương...).

Cơ chế bệnh sinh của bệnh lao hiện nay chưa rõ hoàn toàn. Vi khuẩn này không có nội và ngoại độc tố. Người ta chưa xác định được yếu tố độc lực của trực khuẩn lao. Nhưng có lẽ nó là một tập hợp của nhiều yếu tố, trong đó yếu tố sợi (cord factor) và lớp sáp ở vách tế bào trực khuẩn có ý nghĩa rất quan trọng. Các chủng vi khuẩn lao độc lực có chứa đựng nhiều yếu tố sợi mà bản chất hóa học là 6,6'-dimycolyl trehalose. Yếu tố sợi này làm cho vi khuẩn lao gắn với nhau thành bó sợi. Khi làm mất cord factor vi khuẩn lao giảm độc lực.



7.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm là đờm nếu nghi lao phổi, nước não tủy nếu nghi lao màng não, nước tiểu nếu nghi lao thận.

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Nhuộm trực tiếp bệnh phẩm: Ziehl-Neelsen là phương pháp nhuộm đặc hiệu *Mycobacterium*. Nếu thấy một số trực khuẩn bắt màu đỏ và hơi mảnh, thường đứng nối đầu vào nhau là BK dương tính (BK: Bacilli de Koch). Kết quả này chỉ nói là có *Mycobacterium* trong bệnh phẩm, nhưng chưa chắc là trực khuẩn lao. Do vậy hiện nay người ta thay cho chữ BK bằng chữ AFB (Acid Fast Bacilli) để chính xác hơn. Nếu thấy từ 10 - 99 vi khuẩn (AFB) trên 100 vi trường là dương tính. Trong thực tế, dựa vào số lượng trực khuẩn này trên tiêu bản, cùng với các dấu hiệu lâm sàng và X quang đã có thể khẳng định chẩn đoán. Với đờm, người ta có thể dùng phương pháp thuần nhất cho kết quả cao hơn.

+ Nuôi cấy: Bệnh phẩm được xử lý và nuôi cấy trên môi trường Sauton hoặc Loewenstein hay cả hai, cho kết quả chính xác hơn, nhưng rất chậm; hiện nay người ta đang nghiên cứu để tạo ra môi trường mới mà trực khuẩn lao phát triển nhanh hơn.

+ Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) còn gọi là kỹ thuật khuếch đại chuỗi gen. Kết quả chẩn đoán nhanh (khoảng 48 giờ) và chính xác, rất tốt cho chẩn đoán lao ngoài phổi.

- Chẩn đoán gián tiếp

Thực hiện phản ứng huyết thanh tìm kháng thể tương ứng.

7.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Nguyên tắc phòng bệnh

Quan trọng nhất là tiêm Vaccin BCG (*Bacillus Calmette Guerin*). Calmette và Guerin đã nuôi cấy trực khuẩn lao bò rất nhiều lần trên môi trường có mật bò, làm cho trực khuẩn này mất khả năng gây bệnh, nhưng vẫn còn sống và gây được miễn dịch tốt. Hiện nay cả thế giới đều dùng Vaccin này. Chúng ta hiện dùng tiêm cho trẻ em trong chương trình tiêm chủng mở rộng. Với thiếu niên và người trưởng thành chỉ dùng Vaccin này khi Mantoux âm tính.

Nguyên tắc điều trị

Do trực khuẩn lao ngày càng kháng lại kháng sinh, nên người ta thường điều trị kết hợp giữa kháng sinh và hoá trị liệu. Trong những năm 80 của thế kỷ 20, WHO đã đưa ra phác đồ điều trị ngắn ngày có giám sát, gọi tắt là DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course), kết hợp 5 loại thuốc theo công thức 2SHRZ/6HE* với bệnh lao mới.

*Viết tắt: S, Streptomycin; H, Isonazid; R, Rifampicin; Z, Pyrazinamid; E,

Ethambutol.

8. Trục khuẩn Uốn ván (*Clostridium tetani*)

8.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Trục khuẩn thẳng và mảnh, dài từ 3-4 μm , rộng khoảng 0,4 μm , không có vỏ, có lông và di động, bắt màu Gram dương. Khi gặp điều kiện không thuận lợi thì trục khuẩn hình thành nha bào.

- Tính chất nuôi cấy

Trục khuẩn uốn ván kỵ khí tuyệt đối, phát triển tốt trên môi trường thông thường, bởi vì trục khuẩn uốn ván không cần nguồn dinh dưỡng lớn do chuyên hoá đơn giản. ở nhiệt độ 37°C và pH = 7 và kỵ khí tuyệt đối là điều kiện thuận lợi nhất cho trục khuẩn uốn ván phát triển.

- Sức đề kháng

Trục khuẩn uốn ván có thể chết ở nhiệt độ 56°C nhưng ở thể nha bào thì sự tồn tại của nó ở nhiệt độ 120°C trong vòng 30 phút mới chết. Nha bào có thể tồn tại trong rất nhiều năm ở môi trường bên ngoài.

8.2. Khả năng gây bệnh

- Gây bệnh cho động vật: Trục khuẩn uốn ván sống hoại sinh trong ruột người, bò và một số động vật nhai lại khác. Nó sống lâu trong đất, đặc biệt là đất ẩm ướt. Trục khuẩn uốn ván thường gây bệnh cho các loài động vật có vú như bò, ngựa, cừu, chó, mèo và một số động vật nhỏ như thỏ, chuột lang, chuột nhắt.

- Gây bệnh cho người: bệnh uốn ván ở người là một hiện tượng nhiễm độc tố gây nên bởi sự xuyên qua tổ chức. Thời gian nung bệnh từ 5 - 10 ngày, đôi khi lâu hơn. Triệu chứng đầu tiên là đau và căng cơ ở nơi bị thương, dấu hiệu này bệnh nhân thường bỏ qua. Sau đó, triệu chứng xuất hiện rõ rệt. Đầu tiên là cứng hàm do cơ nhai bị co cứng, sau đó tới cơ mặt. Vì vậy bệnh nhân há mồm khó, các cơ mặt co kéo làm cho nét mặt bệnh nhân thay đổi hẳn. Tiếp đến là tổn thương các cơ gáy, cơ lưng, cơ thành ngực, cơ bụng và các cơ chi làm cho lưng và cổ bệnh nhân bị uốn cong, thân chỉ tiếp xúc với giường bởi gót chân, đầu và mông khi lên cơn; vì vậy gọi là bệnh uốn ván.

Giai đoạn cuối của bệnh, sự co thắt cơ lan rộng ra cơ bụng và cơ hoành làm cho bệnh nhân nuốt và thở khó khăn, chức năng hô hấp và tuần hoàn bị rối loạn. Triệu chứng co giật có thể xảy ra ở những nhóm cơ khác nhau, có khi dẫn đến đứt cơ và sai khớp xương. Những cơn co giật như vậy làm bệnh nhân vô cùng đau đớn. Mặc dầu vậy, bệnh nhân hoàn toàn tỉnh táo cho đến lúc chết. Bệnh nhân thường chết

trong tình trạng suy hô hấp cấp tính. Độc tố thần kinh cũng làm cho nhiệt độ bệnh nhân tăng cao, có khi lên đến 41°C, mạch nhanh từ 150 đến 180 lần/phút, huyết áp giảm, nhịp thở nhanh và nông. Ngoài ra còn thấy thay đổi một số thành phần trong máu như kali giảm, đường huyết tăng... gây mất thăng bằng kiềm - toan trong cơ thể.



Hình 16.2. Bệnh uốn ván

8.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: thường là mủ, chất xuất tiết của vết thương, đôi khi có thể lấy các mẫu tổ chức bị dập nát.

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Nuôi cấy: bệnh phẩm được nuôi cấy vào môi trường canh thang V.F (Viande - Foie) hoặc canh thang gan cục - glucose hoặc môi trường Rosenow, ủ ấm 37°C trong vòng 4 - 5 ngày; quan sát khuẩn lạc, nhuộm khuẩn lạc bằng phương pháp nhuộm Gram để xác định hình thể dưới kính hiển vi quang học.

+ Tiêm súc vật thí nghiệm: động vật thí nghiệm tốt nhất là chuột lang hoặc chuột nhắt trắng. Thử nghiệm được tiến hành như sau: nghiền bệnh phẩm cho nát, cho vào 1 ml canh thang vô khuẩn, lắc đều, ly tâm, lấy 0,25 ml dịch nổi ly tâm tiêm vào dưới da. Trong trường hợp dương tính, sau 48 giờ sẽ xuất hiện hiện tượng uốn ván điển hình: co cứng các cơ; sau 48 giờ thí nghiệm, con vật bị chết.

- Chẩn đoán gián tiếp

Thực hiện phản ứng huyết thanh tìm kháng thể tương ứng.

8.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Nguyên tắc phòng bệnh

- Nguyên tắc phòng bệnh không đặc hiệu: Vệ sinh môi trường, nhất là xử lý phân gia súc là rất quan trọng vì đây là nguồn làm ô nhiễm môi trường. Những trường hợp vết thương có khả năng nhiễm trực khuẩn uốn ván cần phải xử lý ngoại khoa cẩn thận như rửa sạch vết thương, rạch rộng, cắt lọc các tổ chức bị dập nát... và tiêm kháng huyết thanh chống uốn ván (serum antitetani = SAT).

- Nguyên tắc phòng bệnh đặc hiệu: Đối với các trường hợp nghi có khả năng nhiễm trực khuẩn uốn ván như vết thương chiến tranh, tai nạn giao thông, tai nạn lao động, vết thương do chó, mèo, chuột... cắn, cần được rửa sạch vết thương và tiêm Vaccin phòng bệnh uốn ván.

Đối với các nước còn có uốn ván sơ sinh, phụ nữ có thai, phụ nữ ở độ tuổi sinh đẻ đều được tiêm Vaccin uốn ván. Phụ nữ có thai được tiêm ba lần (ba mũi) vào những tháng sớm nhất, các mũi cách nhau 4 tuần lễ. **Nguyên tắc điều trị**

Điều trị uốn ván thường tập trung giải quyết một số vấn đề cơ bản sau đây:

- Xử lý vết thương và trung hoà độc tố uốn ván càng sớm càng tốt. Thông thường, người ta dùng từ 100.000 - 200.000 đơn vị SAT.

- Chống co giật bằng các thuốc an thần, giãn cơ và tránh mọi kích thích thần kinh bằng cơ học như các thao tác tiêm truyền, cho ăn; cho bệnh nhân nằm ở phòng yên tĩnh.

- Dùng kháng sinh để diệt mầm bệnh.

- Có chế độ hộ lý, chăm sóc đặc biệt để đề phòng bệnh nhân bị loét.

9. Trực khuẩn ngộ độc thịt (*Clostridium botulinum*)

9.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể

Trực khuẩn thẳng, dài từ 4-8 μm , rộng từ 0,5 - 0,1 μm , hai đầu tròn, không có vỏ, có lông và di động chậm. Nha bào của trực khuẩn hình trứng.

- Tính chất nuôi cấy

Kỵ khí tuyệt đối, nhiệt độ thích hợp từ 24 - 33°C với pH là 7,0. Sự phát triển của trực khuẩn ngộ độc thịt tốt nhất khi có CO₂. Trong môi trường lỏng, trực khuẩn phát triển mạnh, sinh H₂S, sinh hơi, có mùi khó chịu; trong thạch sâu, khuẩn lạc nhỏ, thường làm nứt thạch.

- Sức đề kháng

Nha bào có sức đề kháng rất cao, ở nhiệt độ bình thường nó sống được nhiều năm, ở nhiệt độ 110°C trong 10 phút chưa đủ để diệt nó. Nếu sấy ướt 115°C trong 4 phút thì mới diệt được 80% nha bào, 8 phút mới diệt được 95%, phải ở nhiệt độ 120°C trong vòng 10 phút mới diệt được hoàn toàn nha bào.

9.2. Khả năng gây bệnh

Biểu hiện lâm sàng: bệnh nhân mắc bệnh khi ăn phải thức ăn có nhiễm khuẩn. Thời kỳ ủ bệnh từ 6 đến 8 giờ, nhưng có khi tới 8 đến 10 ngày. Sau thời kỳ ủ bệnh, bệnh nhân thấy đau bụng vùng thượng vị, nôn mửa, ỉa chảy (có khi táo bón). Đồng thời có biểu hiện thần kinh như trông không rõ, nhìn đôi, có khi không nhìn thấy gì, nhận

thức về sự việc không minh bạch, nhức đầu, choáng váng. Ngoài ra có thể gây rối loạn thần kinh cơ: gây liệt đối xứng hoặc không. Trong giai đoạn cuối của bệnh, nếu không được điều trị kịp thời, bệnh nhân khó thở, thở nhanh nông và cuối cùng chết do ngạt thở. Một số trường hợp bệnh nhân vẫn tỉnh táo cho đến lúc chết. Trong những trường hợp nặng, nếu khỏi có thể để lại di chứng.

9.3. Chẩn đoán vi sinh

- Bệnh phẩm: chất nôn, dịch rửa dạ dày, nếu còn thức ăn mà trước đó bệnh nhân đã ăn là tốt nhất. Cho bệnh phẩm vào nước muối sinh lý vô khuẩn, ly tâm lấy cặn.

- Chẩn đoán trực tiếp

+ Nuôi cấy: cặn ly tâm được cấy vào môi trường canh thang V.F hoặc V.L glucose. Đun nóng các ống môi trường ở nhiệt độ 100°C trong vài phút sau đó cấy bệnh phẩm rồi ủ ấm ở nhiệt độ 33°C từ 3 - 4 ngày, đưa ra quan sát các tính chất mọc của trực khuẩn ngộ độc thịt.

+ Tiêm cho động vật thí nghiệm: Người ta lấy bệnh phẩm hoặc canh thang (sau khi nuôi cấy và ủ ấm 33°C trong 3 - 4 ngày) ly tâm, rồi lấy nước nổi tiêm cho chuột nhắt trắng. Nếu trong thực phẩm có độc tố hoặc trong nuôi cấy trực khuẩn đã tiết ra độc tố thì chuột nhắt trắng bị liệt rất điển hình và sẽ chết.

- Chẩn đoán gián tiếp

Phương pháp chẩn đoán huyết thanh học người ta ít áp dụng vì ít có giá trị.

9.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu

Cần quan tâm đến khâu bảo quản và chế biến thực phẩm hợp vệ sinh. Thức ăn hàng ngày cần được đun nấu kỹ.

Phòng bệnh đặc hiệu

Tiêm phòng cho những đối tượng có nguy cơ mắc bệnh bằng giải độc tố ngộ độc thịt. Tuy vậy, loại Vaccin này hiện nay không được thông dụng vì giá thành đắt.

Nguyên tắc điều trị

Khi phát hiện bệnh nhân có nguy cơ ngộ độc thịt thì cần tiến hành rửa dạ dày hoặc tìm mọi biện pháp cho bệnh nhân nôn hết thức ăn có trong dạ dày. Đồng thời tiêm huyết thanh kháng độc tố ngộ độc thịt, tốt nhất là dùng loại đa giá (polyvalent). Ngoài ra còn phải điều trị phối hợp với các thuốc chống trụy tim mạch, nâng cao thể trạng cho bệnh nhân.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Chọn ý đúng về *salmonella*

- A. Gây bệnh viêm đường hô hấp, nhiễm khuẩn huyết.
 - B. Viêm da mủ, nhiễm độc thức ăn.
 - C. Gây bệnh ly.
 - D. Gây bệnh thương hàn và nhiễm độc thức ăn.
2. Chọn ý đúng về trực khuẩn lao
- A. Trực khuẩn kháng cồn, kháng acid, nên nhuộm bằng phương pháp Ziehl-Neelsen.
 - B. Gây các nhiễm trùng cơ hội.
 - C. Gây nên chủ yếu là nhiễm khuẩn mủ màng phổi.
 - D. trực khuẩn gram (+), gây nhiễm khuẩn hô hấp cấp.
3. Đặc điểm của *Haemophilus influenzae*
- A. Là nguyên nhân quan trọng gây nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính ở trẻ em.
 - B. Nhạy cảm với nhiều nhóm kháng sinh.
 - C. Thuộc nhóm trực khuẩn đường ruột.
 - D. Gây bệnh cúm.
4. Lựa chọn môi trường thích hợp để phân lập *V. cholera*
- A. Peptol kiềm
 - B. Thạch máu
 - C. Thạch thường
 - D. Canh thang.

Bài 7. XOẮN KHUẨN GÂY BỆNH

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Mô tả được đặc điểm chung của xoắn khuẩn giang mai và leptospira.
- Trình bày được đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh của xoắn khuẩn giang mai và leptospira
- Mô tả được các kỹ thuật thường dùng trong chẩn đoán xoắn khuẩn giang mai và leptospira.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Xoắn khuẩn giang mai (*Treponema pallidum*)

1.1. Đặc điểm sinh học

1.1.1. Hình thể

Rất mảnh, đường kính 0,2 μm , dài 5- 15 μm . Quan sát sống dưới kính hiển vi nền đen: chuyển động xoay tròn gần như không di chuyển vị trí (Hình ...). Nhuộm Fontana-Tribondeau: vi khuẩn có màu vàng nâu, sóng hình sin.

1.1.2. Tính chất nuôi cấy

Cho đến nay chưa nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo. Việc giữ chủng giang mai do Nichols phân lập năm 1911 từ một bệnh nhân bị giang mai liệt toàn thân, được thực hiện bằng cách cấy truyền liên tục trong tinh hoàn thỏ.

1.1.3. Sức đề kháng

Cho đến nay chưa nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo. Việc giữ chủng giang mai do Nichols phân lập năm 1911 từ một bệnh nhân bị giang mai liệt toàn thân, được thực hiện bằng cách cấy truyền liên tục trong tinh hoàn thỏ.

1.2. Khả năng gây bệnh

Các nhiễm khuẩn tự nhiên xoắn khuẩn giang mai chỉ xảy ra ở người. Các thực nghiệm trên thỏ hoặc khỉ, không gây thành bệnh giang mai.

1.2.1. Bệnh giang mai mắc phải

Có thể lây qua niêm mạc mắt, miệng hoặc da bị sây sát hoặc dụng cụ bị nhiễm nhưng những trường hợp này hiếm. Việc lây truyền chủ yếu là do tiếp xúc trực tiếp qua đường sinh dục. Xoắn khuẩn vào cơ thể, gây bệnh và bệnh được diễn biến qua 3

thời kỳ:

Giang mai thời kỳ 1 (primary syphilis): Từ 10-90 ngày sau khi nhiễm vi khuẩn.

Bệnh tích chủ yếu là vết loét “săng” (chancre) ở bộ phận sinh dục; vết loét không ngứa, không đau, loét nông và chân cứng. Kèm theo có hạch rắn ở vùng lân cận. Trong dịch tiết của vết loét và dịch trong hạch có nhiều xoắn khuẩn. Đây là thời kỳ lây lan mạnh. Có điều trị hay không thì vết loét cũng khỏi và không để lại sẹo. Từ hạch bạch huyết, vi khuẩn vào máu.

Giang mai thời kỳ 2 (secondary syphilis): Từ 2- 12 tuần sau khi có săng.

Biểu hiện: đa dạng, có thể nhức đầu, sốt nhẹ, rụng tóc... và điển hình là các thương tổn trên da như các loại sẩn, dát màu hoa đào (nốt hồng ban- roseola) có thể ở một chỗ hay toàn thân kể cả lòng bàn tay, bàn chân nhưng hay gặp nhất là ở cổ. Các nốt này xuất hiện nhiều lần và khỏi không để lại dấu vết gì. Trong nốt hồng ban có rất ít vi khuẩn, song vẫn là thời kỳ lây lan mạnh. Một số bệnh nhân có thể chuyển sang thời kỳ 3.



Hình 15.4. Nốt hồng ban trong bệnh giang mai mắc phải

Giang mai thời kỳ 3 (tertiary syphilis): Sau thời gian tiềm tàng từ vài năm cho đến vài chục năm. Tổn thương ăn sâu vào tổ chức, tạo nên các “gôm” (gumma) ở da, xương, gan, đặc biệt là tổn thương tim mạch và thần kinh trung ương (liệt). Hiếm thấy vi khuẩn trong gôm.

1.2.2. Bệnh giang mai bẩm sinh

Phụ nữ có thai bị bệnh giang mai, xoắn khuẩn có thể qua rau thai vào thai nhi gây sẩy thai, thai chết lưu, đẻ non hoặc đứa trẻ sinh ra đã mắc bệnh giang mai (giang mai bẩm sinh).

1.2.3. Gây bệnh thực nghiệm

Có thể gây bệnh thực nghiệm cho thỏ bằng cách đưa vào trong da hay trong

mắt. Tiêm truyền để nhân giống chủng giang mai dùng cho các phản ứng huyết thanh chẩn đoán phải đưa vào tinh hoàn thỏ. Sau khi tinh hoàn thỏ bị viêm, lấy dịch hoàn bị viêm tiêm vào tinh hoàn thỏ khác.

1.3. Chẩn đoán vi sinh

1.3.1. Bệnh phẩm: dịch tiết

1.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Tìm xoắn khuẩn giang mai, chỉ áp dụng được cho giang mai thời kỳ 1. Lấy côn lau sạch vết loét, lấy gạc chà xát vết loét, chờ đến khi có dịch trong tiết ra; lấy dịch tiết soi tươi trên kính hiển vi nền đen (Hình...) hoặc nhuộm Fontana - Tribondeau. Nếu có hạch, dùng bơm tiêm chọc hạch, hút lấy dịch tìm vi khuẩn.

Giá trị của phương pháp này: Nếu kết quả (+) rõ, kết hợp với tiền sử và lâm sàng có thể kết luận được bệnh.

1.3.3. Chẩn đoán gián tiếp

Tìm kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân, áp dụng cho giang mai thời kỳ 2 và 3.

*** Phản ứng không đặc hiệu**

Dùng kháng nguyên là chất lipoid chiết xuất từ tim bò (cardiolipin) nhưng có cấu trúc gần giống chất lipoid của xoắn khuẩn giang mai, do đó đây là kháng nguyên không đặc hiệu. Cũng vì vậy, chỉ phát hiện được reagin (phản ứng tố) trong huyết thanh bệnh nhân. Reagin hình thành là do kích thích của chất lipoid của xoắn khuẩn và chống lại chất lipoid này. Với kháng nguyên cardiolipin có thể tiến hành các phản ứng:

- Lên bông (kết tủa): VDRL (Venereal Disease Research Laboratories)
- RPR (Rapid Plasma Reaction) là một cải tiến của VDRL.

Ngoài ra còn có thể làm phản ứng giọt máu, Citochol trong điều tra cơ bản.

Giá trị: Vì kháng nguyên không đặc hiệu nên có thể có những trường hợp (+) giả đối với một số bệnh khác như sốt rét, thận hư nhiễm mỡ hoặc phụ nữ có thai > 7 tháng. Do vậy phải làm phản ứng không đặc hiệu này hai lần nhằm kiểm tra (sự lặp lại) kết quả hoặc làm phản ứng đặc hiệu.

*** Phản ứng đặc hiệu**

Dùng kháng nguyên là xoắn khuẩn giang mai.

- Phản ứng TPI (*Treponema Pallidum* Immobilization): Phản ứng bất động xoắn khuẩn giang mai. Trộn một giọt huyết thanh bệnh nhân và một giọt xoắn khuẩn giang mai lấy từ tinh hoàn thỏ bị viêm, quan sát dưới kính hiển vi nền đen. Nếu có kháng thể đặc hiệu, xoắn khuẩn bị bất động (nằm im).

Thực hiện phản ứng này có nhiều khó khăn nhưng kết quả 100% (+) ở bệnh

nhân giang mai bẩm sinh và giang mai thời kỳ 3 không điều trị.

- Phản ứng FTA (Fluorescence Treponema Antibody): Phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, dùng xoắn khuẩn đã bị giết chết trộn với huyết thanh bệnh nhân và γ -globulin-kháng kháng thể gắn huỳnh quang. Nếu có kháng thể đặc hiệu, xoắn khuẩn sẽ phát sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang. Đây là phản ứng đặc hiệu và rất nhạy.

- Phản ứng TPHA (*Treponema Pallidum* Haemagglutination): Phản ứng ngưng kết hồng cầu thụ động; dùng kháng nguyên từ xoắn khuẩn giang mai hấp thụ trên mặt tế bào hồng cầu. Phản ứng này có độ nhạy như FTA.

1.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Giang mai là một bệnh xã hội, gây nhiều hậu quả nguy hiểm, đứng thứ hai sau AIDS nên nhiệm vụ của toàn xã hội là giáo dục nếp sống lành mạnh, an toàn tình dục. Nhiệm vụ của y tế là: Phát hiện bệnh nhân sớm, ngăn chặn tiếp xúc, điều trị sớm và điều trị triệt để.

Dùng penicillin (từ trước đến nay chưa thấy xoắn khuẩn đề kháng kháng sinh), ngoài ra còn có thể dùng tetracyclin (nếu bị dị ứng penicillin).

2. Leptospira

2.1. Đặc điểm sinh học

2.1.1. Hình thể

Rất mảnh, đường kính 0,1-0,2 μm , dài 5-25 μm . Quan sát vi khuẩn sống dưới kính hiển vi nền đen thấy di động mạnh. Phải nhuộm theo phương pháp nhuộm thấm bạc Fontana- Tribondeau mới phát hiện được vi khuẩn: mảnh như sợi tóc, hai đầu cong như móc câu. Dưới kính hiển vi điện tử phóng đại khoảng 10.000 lần mới thấy các vòng xoắn nhỏ, sát nhau

2.1.2. Tính chất nuôi cấy

Đây là xoắn khuẩn duy nhất nuôi cấy được trong điều kiện hiếu khí. Thường nuôi trong môi trường lỏng có thêm huyết thanh động vật (thỏ) tươi (sản xuất theo Terskich hoặc Korthoff); pH 7,2- 7,5; nhiệt độ 28-30°C và giàu oxy. *Leptospira* mọc chậm, sau 6-10 ngày mới phát triển tốt: Làm vẩn nhẹ môi trường như khói thuốc lá.

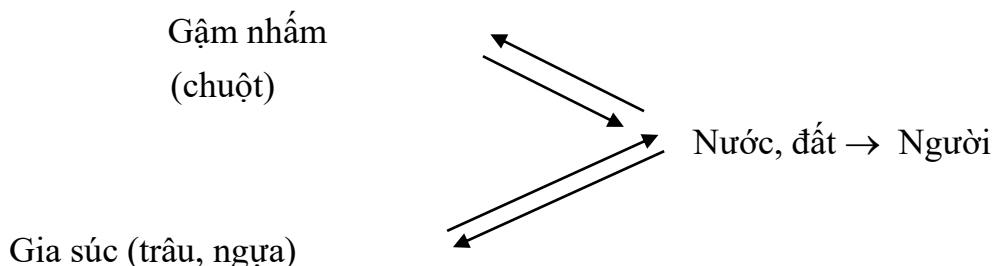
2.1.3. Sức đề kháng

Nói chung các *Leptospira* có sức đề kháng yếu, song cao hơn các xoắn khuẩn khác; chết nhanh trong môi trường acid. *Leptospira* có thể sống tự do ở trong đất, trong nước ngọt và mặn (sống được hàng tháng) nhưng có ánh sáng mặt trời thì nhanh chết.

2.2. Khả năng gây bệnh

2.2.1. Gây bệnh ở người

Đây chuyền dịch tế: Nguồn lây là các súc vật mang *Leptospira* và nước tiểu của chúng. ổ chứa thường xuyên là loại gặm nhấm (chuột), chúng luôn đào thải *Leptospira*. ổ chứa không thường xuyên là gia súc, trâu, bò, ngựa...



Đường lây: Qua da bị xây xước, qua vết thương hoặc qua niêm mạc do tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp với nguồn lây; ví dụ, những người tiếp xúc trực tiếp với gia súc bị bệnh như bác sĩ thú y, công nhân chăn nuôi hoặc mô gia súc... Nhưng có thể nhiễm khuẩn gián tiếp qua nước, đất bị nhiễm *Leptospira* như bộ đội, công nhân lâm nghiệp, công nhân hầm mỏ,...

Bệnh Leptospirosis diễn biến qua 2 thời kỳ:

- Thời kỳ 1: Sốt cao đột ngột sau thời gian ủ bệnh 1-2 tuần. Trong máu có nhiều vi khuẩn. Sốt kéo dài 3-8 ngày.
- Thời kỳ 2: Sốt trở lại do các cơ quan, nhất là gan và thận bị tổn thương (vàng da, albumin niệu); có thể có hội chứng màng não do thần kinh trung ương bị tổn thương. Các mao mạch giãn (có thể xuất huyết) và đau cơ. Xoắn khuẩn nằm lại thận và được đào thải theo nước tiểu ra ngoài. ở giai đoạn này cơ thể đã hình thành kháng thể.

Ở nước ta, bệnh hay gặp ở những người làm việc trong rừng và gần rừng như bộ đội (biên giới), công nhân địa chất, lâm nghiệp, hầm mỏ, công nhân chăn nuôi và nông dân.

2.2.2. Gây bệnh thực nghiệm

Súc vật rất nhạy cảm với *Leptospira* là chuột lang, nhất là đối với *L. icterohaemorrhagiae*. Nếu trong bệnh phẩm có lẫn tạp khuẩn mà đem tiêm vào phúc mạc chuột lang non thì sau 10 phút *Leptospira* đã xâm nhập vào máu trong khi các tạp khuẩn khác chưa vào được máu. Vì vậy Schuffner đã gọi chuột lang là “cái lọc sống” đối với *Leptospira*.

2.3. Chẩn đoán vi sinh

2.3.1. Bệnh phẩm

Tùy theo từng thời kỳ của bệnh mà có cách lấy bệnh phẩm và chẩn đoán thích hợp.

2.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

- Lấy máu lúc bệnh nhân sốt cao, đem nuôi cấy và/hoặc tiêm truyền vào chuột lang; sau đó xác định và định loại vi khuẩn.
- Có thể lấy nước tiểu bệnh nhân, ly tâm, tiêm vào phúc mạc chuột lang non; sau đó lấy máu tim chuột nuôi cấy tìm vi khuẩn.

2.3.2. Chẩn đoán gián tiếp

- Lấy máu bệnh nhân tìm kháng thể bằng phản ứng ngưng kết “tan” Martin-Pettit. Kháng nguyên là *Leptospira* sống (12 týp huyết thanh hay gặp ở Việt nam). Huyết thanh bệnh nhân được pha loãng thành nhiều nồng độ. Nơi có tỷ lệ kháng nguyên - kháng thể thích hợp nhất sẽ có hiện tượng “ngưng kết sao”- phản ứng (+). Vì *Leptospira* có nhiều kháng nguyên trùng chéo nên hiệu giá kháng thể lần đầu phải cao hơn 1/800 mới nghi ngờ; nên làm phản ứng 2 lần để xác định động lực kháng thể (ít nhất là gấp hai lần).

Trong thực tế, chẩn đoán Leptospirosis bằng phản ứng huyết thanh hay được áp dụng hơn; vì phương pháp nuôi cấy tìm vi khuẩn rất phức tạp, khó thực hiện.

2.3.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu bằng cách cắt đứt dây chuyền dịch tễ như diệt chuột, phòng bệnh cho gia súc nhưng chủ yếu là phòng hộ lao động cho những đối tượng phải tiếp xúc với nguồn lây. Nói chung có nhiều khó khăn.

Phòng bệnh đặc hiệu bằng Vaccin chết, song chỉ cho các đối tượng phải tiếp xúc với nguồn lây.

Nguyên tắc điều trị

Dùng kháng sinh penicillin, tetracyclin; hiệu quả điều trị cao nếu kháng sinh được dùng sớm, ngay từ những ngày đầu của bệnh. Điều trị triệu chứng cũng đóng vai trò quan trọng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 8. VI KHUẨN NỘI BÀO

MỤC TIÊU

* Kiến thức

- Trình bày đặc điểm sinh học của Rickettsia, Mycoplasma, Chlamydia.
- Trình bày được khả năng gây bệnh của Rickettsia, Mycoplasma và Chlamydia.
- Mô tả được các phương pháp chẩn đoán vi khuẩn học Rickettsia, Mycoplasma và Chlamydia.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Mycoplasma

1.1. Đặc điểm sinh học

1.1.1. Hình thể

Mycoplasma là những vi khuẩn rất nhỏ, không di động, không sinh nha bào. Hình thể rất đa dạng (hình thoi, hình gậy ngắn hoặc hình cầu). *Mycoplasma* không bắt màu Gram, rất khó nhuộm vì dễ biến dạng khi qua các bước nhuộm.

Mycoplasma không có vách tế bào.

1.1.2. Tính chất nuôi cấy

Mycoplasma có thể sinh sản và phát triển trên những môi trường có hoặc không có tế bào sống. ở môi trường không có tế bào, *Mycoplasma* đòi hỏi những chất dinh dưỡng đặc biệt như huyết thanh ngựa, chiết xuất men... Nhiều loài *Mycoplasma* kỵ khí hoặc hiếu khí tuyệt đối nhưng cũng có loài *Mycoplasma* kỵ khí tùy tiện. Nhiệt độ tốt nhất để *Mycoplasma* phát triển là từ 35- 37°C với pH từ 7,0-7,8.

Trong môi trường lỏng, vi khuẩn không làm đục môi trường. Trên môi trường đặc, vi khuẩn mọc thành khuẩn lạc điển hình: Trung tâm khuẩn lạc tối và dày, mọc lún xuống thạch, rìa khuẩn lạc mỏng và bệt trông như một quả trứng rán mà trung tâm khuẩn lạc là phần lòng đỏ để nguyên. Khuẩn lạc của *Mycoplasma* nhỏ.

1.1.3. Sức đề kháng

Mycoplasma tương đối bền vững khi dùng phương pháp đông băng và thoát băng. Trong huyết thanh, *Mycoplasma* có thể tồn tại ở 56°C trong hai giờ. *Mycoplasma* dễ bị phá hủy bởi siêu âm và bị tiêu diệt bởi dung dịch có pH acid hoặc kiềm cao. Tất cả các loài *Mycoplasma* đề kháng với penicillin.

1.2. Khả năng gây bệnh

Mycoplasma có thể gây bệnh ở đường hô hấp, đường sinh dục tiết niệu và bao khớp. Bệnh xảy ra ở mọi lứa tuổi nhưng hay gặp nhất là ở trẻ em.

M. pneumoniae gây nên các vụ dịch nhỏ ở các tập thể như trường học, quân đội... vào mùa xuân và mùa thu. Một số týp lây qua đường sinh dục-tiết niệu do quan hệ tình dục.

1.3. Chẩn đoán vi sinh

1.3.1. Bệnh phẩm

Chất ngoáy họng, chất bài tiết của cuống phổi, chất tiết cổ tử cung, mũ âm đạo, niệu đạo, ở nam giới có thể lấy chất mũi, chất nhầy giống nhựa chuối tiết vào buổi sáng sớm của niệu đạo.

1.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường giàu chất dinh dưỡng, sau 18-48 giờ đã xuất hiện khuẩn lạc. Xác định có thể dựa vào hình dạng khuẩn lạc và các tính chất sinh hóa học.

Để định loại, xác định khả năng làm tan máu và hấp thụ hồng cầu, tính chất lên enzym glucose, tính chất khử oxy của tetrazolium và bằng các phương pháp miễn dịch học khác (ức chế sự phát triển, ức chế ngưng kết hồng cầu, miễn dịch huỳnh quang).

1.3.3. Chẩn đoán gián tiếp

Có thể dùng phản ứng kết hợp bổ thể (kháng nguyên thô hay lipid tinh khiết) tỷ lệ dương tính đạt khoảng 80% các trường hợp hoặc các phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (1/80), ngưng kết hồng cầu thụ động v.v...

1.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu

Đối với bệnh viêm phổi không điển hình, khi đã phát hiện cần cách ly bệnh nhân. Đối với những trường hợp bị bệnh đường sinh dục tiết niệu, cần điều trị dứt điểm, trong thời gian điều trị cần được cách ly, không quan hệ tình dục.

Phòng bệnh đặc hiệu

Có thể dùng Vaccin: loại Vaccin bất hoạt bằng formalin có hay không có aluminum hoặc tá dược dầu đều có kết quả phòng ngừa.

Nguyên tắc điều trị

Trước đây hay dùng tetracyclin, chloramphenicol, spiramycin. Ngày nay có thể dùng doxycyclin, cefalotin, cefotaxim có hiệu quả rất tốt.

2. Rickettsia

2.1. Đặc điểm sinh học

2.1.1. Hình thể

Rickettsia là những vi khuẩn không di động, kích thước khoảng 0,5-1,0 μm , đứng riêng rẽ hoặc thành từng đôi trong hoặc ngoài tế bào. *Rickettsia* không bắt màu Gram.

2.1.2. Tính chất nuôi cấy

Rickettsia ký sinh bắt buộc trong tế bào, vì vậy việc nuôi cấy chúng phải dựa vào tế bào sống, cảm thụ trong các chiết xuất tế bào. Có thể nhân chúng bằng các phương pháp sau đây:

- Tiêm vào gặm nhấm như chuột lang, chuột nhắt trắng, đặc biệt là nhân lên trong tế bào phổi sau khi chuột hít *Rickettsia* qua đường khí quản. Tổn thương chủ yếu xuất hiện ở màng trong tế bào các mao mạch.
- Gây bệnh thực nghiệm ở côn trùng, tiết túc trung gian như ve, bọ, rận (đặc biệt là tiêm qua hậu môn vào ruột rận).
- Tiêm vào lòng đỏ của bào thai gà 7 ngày, để ở nhiệt độ 34 - 37°C, *Rickettsia* phát triển nhiều ở màng niệu đệm và nhất là ở túi noãn hoàng.

Trong thực nghiệm, *Rickettsia* được nhân lên trong tế bào bằng cách phân đôi, cắt ngang, chúng đứng riêng rẽ hoặc tập trung thành từng đám bên trong tế bào. Khi các tế bào vỡ ra, *Rickettsia* được giải phóng vào môi trường gian bào và tiếp tục gây nhiễm các tế bào khác.

2.1.3. Sức đề kháng

Rickettsia là những vi khuẩn rất yếu, bị tiêu diệt nhanh chóng bởi sức nóng, độ ẩm, độ khô và các chất hóa học, bị bất hoạt ở nhiệt độ thường nhưng tồn tại tốt ở nhiệt độ thấp (-25 đến -70°C) bằng phương pháp đông lạnh.

2.2. Khả năng gây bệnh

- Gây bệnh cho người

Các *Rickettsia* gây bệnh có thể gây nhiễm với những tiến triển khác nhau, biểu hiện dưới dạng có sốt, thường kèm theo phát ban điển hình ở da. Đặc biệt đa số các trường hợp bệnh đều có tổn thương ở mạch máu nhỏ kiểu viêm hoặc viêm tắc mao mạch.

- Gây bệnh cho động vật

Có 6, 7 loài phụ của *Rickettsia* có khả năng gây bệnh cho động vật có sừng (dê, cừu...) và chó. Trong số đó hay gặp nhất là loại phụ *R. ruminantium* thường gây nên bệnh tràn dịch màng tim ở động vật.

2.3. Chẩn đoán vi sinh

2.3.1. Bệnh phẩm

Nếu là người bệnh thì lấy máu khi sốt hoặc chọc hạch khi có hạch viêm. Lấy nước não tủy hay mảnh tổ chức khi mổ tử thi. Trong trường hợp điều tra dịch tễ học, có thể lấy các phủ tạng của gặm nhấm hoặc chính bản thân ve, bọ, mò, rận...

2.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

- Nhuộm bệnh phẩm và soi kính: nhuộm đặc biệt bằng Macchiavello hoặc bằng phương pháp mới Gimenez hoặc miễn dịch huỳnh quang.
- Nuôi cấy: Bệnh phẩm được nghiền nát cho vào nước muối sinh lý vô khuẩn, ly tâm lấy nước trong, tiêm vào bào thai gà hoặc nuôi cấy tế bào và tiêm cho động vật thí nghiệm.

2.3.3. Chẩn đoán gián tiếp

Để xác định động lực kháng thể kháng *Rickettsia* trong máu bệnh nhân, cần được lấy máu hai lần. Có nhiều phương pháp huyết thanh học đặc hiệu như: phản ứng ngưng kết đặc hiệu, phản ứng kết hợp bổ thể, phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu, phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp. Hoặc áp dụng thử nghiệm kết tủa với chất đồng vị phóng xạ để chẩn đoán bệnh sốt "Q", kỹ thuật ELISA...

2.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh không đặc hiệu

- Xua đuổi hoặc tiêu diệt côn trùng tiết túc như phát quang bụi rậm, dùng hóa chất...
- Cách ly bệnh nhân khi có dịch sốt phát ban, nếu có điều kiện thì cho những người tiếp xúc thường xuyên với bệnh nhân hoặc những người ở vùng dịch có nguy cơ mắc bệnh uống hóa dược dự phòng.

Phòng bệnh đặc hiệu

- Vaccin chết: dùng Vaccin này thì không tạo ra được một miễn dịch hoàn toàn đảm bảo nhưng có tác dụng chuyển bệnh sang thể nhẹ, lành tính.
- Vaccin sống giảm độc lực: loại Vaccin này có tiến bộ hơn so với Vaccin chết song vẫn còn nhiều nhược điểm như còn chứa thành phần protein cảm nhiễm của tổ chức lòng đỏ trứng gà, kỹ thuật sử dụng còn phức tạp như vấn đề chuẩn bị hàng loạt cũng như vấn đề bảo quản Vaccin.
- Vaccin sống phối hợp với kháng sinh. Cơ sở của loại Vaccin này là có một số chủng *Rickettsia* độc lực khi xử lý một loại kháng sinh thích hợp với liều lượng ức chế thì chủng *Rickettsia* đó trở nên vô độc cho súc vật cảm nhiễm và có tác dụng gây miễn dịch rất tốt đối với súc vật.

Nguyên tắc Điều trị

Ngày nay có nhiều loại kháng sinh như aureomycin, biomycin, lincomycin, fluoroquinolon dùng để điều trị Rickettsiosis bên cạnh chloramphenicol và

tetracyclin. Đối với trẻ em và phụ nữ mang thai, người ta dùng rovamycin (nhóm macrolide). Kháng sinh có tác dụng ức chế *Rickettsia* nên có ý nghĩa lớn trong việc giảm tỷ lệ tử vong, rút ngắn thời gian sốt của nhiều bệnh *Rickettsia* khác nhau.

3. Chlamydia

3.1. Đặc điểm sinh học

3.1.1. Hình thể

Chlamidia là những vi khuẩn nhỏ, không di động, có dạng hình cầu, có thể nhuộm bằng xanh methylen hoặc Macchiavello và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Trên kính hiển vi điện tử, chúng biểu hiện một vùng hội tụ bên trong với một màng ranh giới. Hình ảnh trên kính hiển vi điện tử giống như các hình ảnh của *Rickettsia*.

Vòng đời của *Chlamydia* qua 2 dạng:

- Dạng cơ bản (elementary bodies): là những tế bào tròn (0,3 μm), nhân đậm. Thể này xâm nhập vào các tế bào theo kiểu thực bào.
- Dạng lưới (reticulate bodies): sau khi xâm nhập vào tế bào, *Chlamydia* chuyển hoá nhờ tế bào và tạo thành dạng lưới (1 μm), sinh sản theo kiểu song phân rồi giải phóng ra các dạng cơ bản rồi tiếp tục xâm nhập vào các tế bào mới.

Chlamydia trachomatis

Dưới kính hiển vi quang học, vi khuẩn có hình cầu hoặc bầu dục, kích thước khác nhau. Dưới kính hiển vi điện tử là một vật thể nhân dày đặc gắn liền với màng bọc đặc trưng của vách tế bào.

Chlamydia psittaci

Kích thước của vi khuẩn rất bé, siêu lọc, và có thể quan sát chúng bằng kính hiển vi điện tử. Có thể nhuộm vi khuẩn bằng xanh methylen hoặc bằng phương pháp Machiavello.

3.1.2. Tính chất nuôi cấy

Chlamydia không thể nuôi cấy trên các môi trường nhân tạo bởi vì chúng ký sinh bắt buộc trong tế bào sống cảm thụ. *Chlamydia* được nhân lên trong tế bào của súc vật thí nghiệm như chuột nhắt trắng, trong bào thai gà... Chúng cũng có khả năng phát triển tốt trên các tế bào nuôi, tế bào lấy từ tổ chức ra (tế bào thận khỉ); trong trứng gà ấp, chúng phát triển ở màng niệu đệm, nhất là trong túi noãn hoàng.

Chlamydia trachomatis

Nuôi cấy *Chlamydia trachomatis* trong túi lòng đỏ trứng gà, vi khuẩn nhân lên ở màng niệu đệm và nhất là ở túi noãn hoàng (Sac vitellin). Ngoài ra có thể nuôi cấy *C. trachomatis* vào tế bào thận khỉ, tế bào Hela hoặc tế bào thai người.

Chlamydia psittaci

C. psittaci có thể nuôi cấy được trong nuôi cấy tế bào như tế bào thận khi, trong màng niệu đê mê trứng gà ấp (đặc biệt là trong túi noãn hoàng).

3.1.3. Sức đề kháng

Chlamydia khả năng qua lọc vi khuẩn kém, chúng rất yếu, dễ bị tiêu diệt bởi sức nóng, tia cực tím và các chất sát khuẩn. Glycerin không bảo tồn được *Chlamydia* mà chỉ có nhiệt độ lạnh trong máy đông lạnh mới có thể bảo tồn được chúng.

Chlamydia trachomatis

Những hóa chất diệt khuẩn và ête có khả năng tiêu diệt nhanh chóng *C. trachomatis*. Nó cũng bị mất tác dụng bởi glycerin nhưng có khả năng tồn tại ở nhiệt độ lạnh.

Chlamydia psittaci

Vi khuẩn có khả năng đề kháng kém với sức nóng: ở nhiệt độ 60°C trong 10 phút đã ngừng hoạt động. Nhạy cảm với các hóa chất như formol, phenol và ête. Nó không tồn tại được trong glycerin, nhưng có khả năng đề kháng với nhiệt độ lạnh. Vi khuẩn có thể tồn tại ở nhiệt độ lạnh của máy đông lạnh.

3.2. Khả năng gây bệnh

Chlamydia trachomatis

C. trachomatis có khả năng gây nên hai bệnh chính cho người: Bệnh mắt hột và bệnh nhiễm trùng sinh dục tiết niệu.

- *Bệnh mắt hột*: viêm kết mạc do mắt hột tiến triển qua 4 giai đoạn:

Giai đoạn một: Viêm kết mạc thể nang thường có kèm theo bội nhiễm vi khuẩn khác.

Giai đoạn hai: Viêm kết mạc thể hạt (Conjunctivite granulaire).

Giai đoạn ba: Giai đoạn biến chứng loét, bội nhiễm và sẹo.

Giai đoạn bốn: Hồi phục kèm theo sẹo kết mạc, loét giác mạc và rất có thể bị mù lòa (nếu không được điều trị tích cực).



Hình . Bệnh mắt hột

- *Bệnh viêm đường tiết niệu-sinh dục lây nhiễm qua đường tình dục (Maladie*

sexuellement transmissibles): Hiện nay bệnh này tăng nhanh về số lượng và gây rất nhiều phiền phức bởi vì dễ gây nên viêm niệu đạo, viêm vòi trứng, buồng trứng, viêm cổ tử cung dẫn đến vô sinh ở nữ giới.

ở nam giới biểu hiện đầu tiên là viêm niệu đạo có mủ mà giới chuyên khoa gọi là viêm niệu đạo không do lậu, sau đó có thể dẫn đến viêm mào tinh hoàn. Trẻ mới sinh có thể bị lây nhiễm *Chlamydia trachomatis* từ người mẹ qua rau thai hoặc xảy ra sau khi đi qua cổ tử cung, âm đạo của người mẹ gây nên viêm kết mạc mắt sơ sinh.

Chlamydia psittaci

Thời kỳ ủ bệnh từ 2-3 tuần lễ, bệnh thể hiện nhiều dạng khác nhau: thương hàn, cúm, viêm phổi. Đối với phụ nữ có thai thường tiếp xúc với loài vẹt bị bệnh, có thể bị nhiễm bệnh và gây sảy thai.

3.3. Chẩn đoán vi sinh

3.3.1. Bệnh phẩm

Chlamydia trachomatis

Đối với bệnh mắt hột, người ta lấy nang bằng cách nạo các nang. Đối với bệnh viêm sinh dục - tiết niệu: lấy mủ chất tiết niệu đạo (nam giới); chất tiết cổ tử cung, âm đạo (nữ giới).

Chlamydia psittaci

Bệnh phẩm là đờm và nước súc họng

3.3.2. Chẩn đoán trực tiếp

Chlamydia trachomatis

Đối với bệnh phẩm mắt hột: cấy vào nuôi cấy tế bào để phát hiện các hạt vùi trong nguyên sinh chất của tế bào và nuôi cấy vào tế bào bào thai người.

Đối với bệnh phẩm sinh dục - tiết niệu: cấy vào tế bào McCoy hoặc Hela 229.

Quan sát tính chất xâm nhiễm bằng cách sau 48 giờ nuôi cấy, người ta xác định bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescence).

+ Chẩn đoán nhanh:

Dùng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp để phát hiện *Chlamydia trachomatis* trên tiêu bản.

Phương pháp ELISA tự động để phát hiện mầm bệnh.

Chlamydia psittaci

Muốn phân lập mầm bệnh, người ta tiêm bệnh phẩm vào túi lòng đỏ trứng gà hay vào màng bụng chuột nhắt trắng hoặc có thể nuôi cấy vào tế bào nuôi.

3.3.2. Chẩn đoán gián tiếp

Chlamydia trachomatis

Người ta dùng phản ứng vi lượng miễn dịch huỳnh quang (microimmuno-fluorescence) để xác định kháng thể, để chẩn đoán loài *Chlamydia trachomatis*, đây là một phản ứng đặc hiệu.

Chlamydia psittaci

Lấy máu của người bệnh hoặc người khỏi bệnh để tìm kháng thể bằng phản ứng kết hợp bổ thể, thường hay dùng kháng nguyên nhóm (kháng nguyên Frei) trong chẩn đoán bệnh Nicolas - Favre.

3.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

Chlamydia trachomatis

- Phòng bệnh không đặc hiệu

+ Đối với bệnh mắt hột: vì là bệnh lây từ người sang người do tình trạng vệ sinh của từng địa phương và từng gia đình. Vì vậy cần tăng cường các biện pháp vệ sinh như không dùng chung khăn mặt, chậu rửa mặt, bảo đảm nguồn nước sạch trong sinh hoạt hàng ngày...

+ Đối với bệnh viêm đường tiết niệu - sinh dục: cần phát hiện sớm người mắc bệnh để điều trị kịp thời và có biện pháp phòng bệnh cho vợ hoặc chồng hoặc cả hai.

- Phòng bệnh đặc hiệu

Trước đây Collier và cộng sự đã nghiên cứu thành công một loại Vaccin sống bằng cách dùng chủng đặc hiệu MRC/4/ON tiêm cho khi đột châu Phi gồm hai mũi dưới da cách nhau một tuần lễ và một mũi tiêm tĩnh mạch và thu được một loại kháng thể phức hợp tồn tại trong vòng một năm. Nhưng Vaccin này vẫn chưa có tác dụng trên người. Các loại Vaccin chết bởi sức nóng, formalin hay tia cực tím không có tác dụng gây miễn dịch. Vì vậy, việc phòng bệnh bằng Vaccin cho đến nay vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu.

*** Nguyên tắc Điều trị**

Cho đến nay *Chlamydia trachomatis* vẫn còn chịu tác dụng của các doxycyclin, tetracyclin và erythromycin.

Chlamydia psittaci

*** Nguyên tắc Phòng bệnh**

Cần tăng cường công tác kiểm tra sức khỏe động vật của ngành thú y, lưu ý đến việc xuất nhập cảnh động vật, các loài chim đặc biệt chú ý là các loài vẹt.

Hiện nay vẫn chưa có Vaccin phòng bệnh sốt vẹt cho người, mặc dù đã có thí nghiệm thành công Vaccin cho vẹt.

*** Nguyên tắc Điều trị**

Cho đến nay, nhóm tetracyclin và macrolid vẫn còn có tác dụng đối với bệnh sốt vệt; có hai loại biệt dược, người ta khuyên nên dùng, là doxycyclin và rovamycin.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 9. VIRUS LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG HÔ HẤP

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày đặc điểm sinh học của lây truyền qua đường hô hấp: virus cúm và virus sởi.
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus cúm và virus sởi
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của virus cúm và virus sởi trong phòng thí nghiệm.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Virus cúm

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

- + Hình cầu
- + Đường kính 100-120 nm
- + Các protein capsid virus cúm, cùng với ARN, tạo thành nucleocapsid đối xứng xoắn.
- + Bao ngoài của virus cúm được cấu tạo bởi 2 lớp lipid, trên bề mặt hai lớp lipid đó có những điểm chồi lên (spike) giống như "lông".
- + Các điểm chồi đó cấu tạo bởi glycoprotein, tạo nên bởi các kháng nguyên hemagglutinin và neuraminidase ký hiệu là H và N.
- + Mỗi sợi H và N dài 8-10 nm, cách nhau 8 nm.
- + Kháng nguyên hemagglutinin có chức năng giúp virus bám trên bề mặt tế bào cảm thụ và xuyên thủng màng tế bào.
- + Chức năng của neuraminidase chưa được rõ, nhưng chúng cũng bổ sung chức năng của hemagglutinin và ngoài ra chúng còn thúc đẩy sự lắp ráp và chín muồi của virus trong tế bào cảm thụ.
- + Hai cấu trúc glycoprotein H và N xác định kháng nguyên đặc hiệu của từng thứ typ virus.
- + Kháng nguyên H và N là những kháng nguyên quyết định khả năng ngưng

kết hồng cầu động vật.

- Sức đề kháng: Virus cúm tương đối vững bền với nhiệt độ; ở 0°C đến 4°C, sống được vài tuần; ở - 20°C và đông khô virus cúm sống hàng năm. Dễ diệt virus cúm ở 56°C. Dễ diệt với các dung môi hoà tan lipid: Ether, formol,... Các tia tím bất hoạt virus cúm nhưng không phá huỷ kháng nguyên nhiễm khuẩn hô hấp, nhiễm khuẩn bào thai và hoạt tính của H và N. Với pH thì vững bền từ 4 đến 9.

- Nuôi cấy: Nuôi cấy ở phôi gà, thận khỉ, các dòng tế bào thường trực

- Sự nhân lên: Virus nhân lên trong đường hô hấp sau 4 đến 6 ngày nhiễm trùng.

Virus đạt hiệu giá tối đa sau 48 giờ. Bệnh thường xảy ra vào mùa đông xuân từ tháng giêng đến tháng 4.

1.2. Khả năng gây bệnh

- Virus cúm typ A thường gây đại dịch với chu kỳ 7 đến 10 năm; cúm typ B thường chỉ gây dịch nhỏ hơn với chu kỳ 5 đến 7 năm. Riêng virus cúm typ C chỉ gây các triệu chứng lâm sàng không điển hình và tạo các vụ dịch nhỏ ở những tập thể mới hình thành

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm: nước xuất tiết đường mũi họng.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Sự nhân lên của ARN virus xảy ra trong nhân tế bào, các thành phần khác xảy ra ở bào tương tế bào hoặc trong màng ối của bào thai gà từ 8 tới 12 ngày. Xác định sự có mặt của virus cúm bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

+ Định typ virus bằng phản ứng trung hòa trong tế bào hoặc ức chế ngưng kết hồng cầu với các kháng thể mẫu.

+ Cũng có thể chứng minh sự có mặt của virus bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang trực tiếp bằng kháng thể mẫu gắn huỳnh quang.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Kháng thể kháng cúm thường tìm được bằng phản ứng kết hợp bổ thể, ức chế ngưng kết hồng cầu, ELISA, và trung hoà..

2. Virus sởi

2.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc :

+ Hình thể: virus sởi hình cầu, đường kính 120 đến 250 nm, chứa ARN sợi đơn, vỏ capsid đối xứng xoắn và có bao ngoài. Trong cấu trúc có thể có 6 protein cấu trúc.

+ Cấu trúc vỏ bao ngoài có các hemagglutinin. Có vai trò giúp virus bám vào

receptor của tế bào cảm thụ, sau đó protein hòa màng và xâm nhập phức hợp tái tổ hợp, thực hiện sự nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ. Sau khi virus được nhân lên, giai đoạn giải phóng của virus thực hiện theo phương thức nảy chồi. Virus sởi là virus đồng nhất, không có sự biến dị của mọi cấu trúc virus, do vậy sau khi nhiễm virus sởi, kháng thể sởi sẽ duy trì suốt đời. Virus sởi chỉ gây bệnh cho người. Hemagglutinin của virus sởi mang tính kháng nguyên ngưng kết hồng cầu khi.

- Sức đề kháng: Virus nhạy cảm đối với ether. Virus sởi có 1 sức đề kháng cao. Nó có thể sống sót nhiều ngày ở 36 độ C, ở 22 độ C sống được trên 2 tuần.

- Nuôi cấy: Để nuôi cấy virus sởi, người ta hay dùng nuôi cấy tế bào thận người và thận khỉ, tế bào màng ôi người, tế bào phôi gà... Virus sởi trong quá trình phát triển ở nuôi cấy tế bào đã gây ra hiệu ứng tế bào bệnh lý như tạo ra những đám tế bào khổng lồ có nhiều nhân và những hạt vùi ưa eosin trong bào tương và trong nhân.

- Sự nhân lên:

+ Virus sởi xâm nhập vào đường mũi họng và đường mắt. Virus nhân lên ở hệ bạch huyết nơi xâm nhập và tế bào đường hô hấp trên rồi đi qua máu.

2.2. Khả năng gây bệnh

- Thời gian ủ bệnh từ 10 tới 12 ngày. Sau đó là thời kỳ khởi phát với các dấu hiệu viêm long của đường hô hấp trên: chảy nước mũi, ho, hắt hơi, đỏ mi mắt... kèm theo sốt nhẹ. Sau đó xuất hiện nốt Koplik trong niêm mạc má. Tiếp theo là bệnh sởi điển hình, thể hiện bằng phát ban theo thứ tự từ trên xuống dưới sau 5-7 ngày. Rồi từ trên xuống mất dần các nốt ban. Sau khi bị sởi, người bệnh sẽ có miễn dịch vĩnh viễn suốt đời.

- Trong năm đầu của cuộc đời, do tiếp nhận kháng thể kháng sởi qua rau thai nên nếu bị nhiễm virus sởi thì triệu chứng sẽ không điển hình. Các dấu hiệu viêm đường hô hấp, các triệu chứng khác đều nhẹ và trong thời gian ngắn, ban xuất hiện không điển hình. Trong các trường hợp này, chỉ có thể chẩn đoán sởi bằng các phản ứng huyết thanh tìm kháng thể kháng sởi.

- Bệnh sởi cũng có thể xuất hiện hình ảnh lâm sàng nặng: viêm não cấp do sởi hoặc viêm xơ chai bán cấp tính do sởi (SSPE). Các biểu hiện viêm não đều phần lớn dẫn tới tử vong.

- Thường xảy ra ở những trẻ em được tiêm vaccin sởi chết hoặc trẻ lớn nhiễm virus sởi. Triệu chứng của những người này là sốt cao, đau đầu, đau ngực, cơ và khớp. Sau 2 đến 4 ngày, xuất hiện các nốt ban không điển hình ở tứ chi. Đôi khi có biểu hiện viêm phổi khối kèm tràn dịch màng phổi. Thể không điển hình này cũng chỉ có thể chẩn đoán bằng các phản ứng huyết thanh.

- Sởi có thể gây nhiều biến chứng:

+ Viêm phổi do sởi: Thường có triệu chứng sốt cao và phế quản viêm do bội nhiễm vi khuẩn. Nguy hiểm thường xảy ra với trẻ em sơ sinh và trẻ nhỏ.

+ Viêm não cấp do sởi (acute measles encephalitis): Bệnh thường xảy ra với tỷ lệ 0,05 tới 0,1% trong các trường hợp bị sởi và gây tử vong 10-40%.

+ Viêm tai giữa do sởi.

+ Viêm xơ chai não bán cấp do sởi (SSPE): Đây là bệnh mạn tính ở não do sởi. Bệnh có thể xuất hiện sau sởi từ 7 đến 10 năm. Trong trường hợp này có thể tìm thấy kháng thể kháng sởi ở nồng độ cao. SSPE là một biểu hiện lâm sàng điển hình của nhiễm trùng chậm. Trong dịch não tủy, có thể tìm thấy protein cấu trúc và kháng nguyên bề mặt của virus sởi.

+ Ngoài ra trong khi bị sởi sức đề kháng của trẻ em suy giảm miễn dịch tạm thời nhiều nên trẻ có thể mắc nhiều bệnh nhiễm trùng cơ hội khác như tiêu chảy, viêm giác mạc dẫn tới mù loà...

2.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Dịch mũi họng.

+ Dịch kết mạc.

- Chẩn đoán trực tiếp :

+ Tìm thấy tiểu thể trong tế bào hoặc tế bào trở thành tế bào khổng lồ, tạo các ổ hoại tử (các đơn vị plaque).

+ Phản ứng miễn dịch huỳnh quang trên tế bào nhiễm virus.

- Chẩn đoán gián tiếp :

+ Tìm thấy kháng thể kết hợp bổ thể, ức chế ngưng kết hồng cầu khi, hoặc phản ứng trung hòa.

+ Phản ứng ELISA tìm kháng thể IgG IgM.

3. Virus quai bị

3.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc :

Quai bị là virus đặc trưng của *Paramyxovirus*. Yếu tố ngưng kết hồng cầu (hemagglutination) gây ngưng kết hồng cầu gà và ngỗng có thể bị ức chế bởi huyết thanh đặc hiệu kháng quai bị và tính chất ức chế này có thể sử dụng để đo lường sự đáp ứng (responses) tạo kháng thể ức chế ngưng kết hồng cầu của người bị bệnh. Tương tự như vậy, phần nucleocapsid của hạt virus là phần chính thứ hai của kháng nguyên hòa tan "S", đây là kháng nguyên kết hợp bổ thể.

- Sức đề kháng:

Thành phần cấu trúc: hemagglutinin, hemolysin, ARN của virus bị phá hủy bởi 56 độ C trong 20 phút. Riêng kháng nguyên test da và kháng nguyên kết hợp bỏ thể thì vững bền với nhiệt độ cao hơn.

- Nuôi cấy: Virus quai bị có thể được nuôi cấy trên tế bào thai gà và tế bào thường trực vero... Quá trình cấy truyền qua bào thai gà thì virus giảm khả năng gây bệnh, do đó bằng phương pháp này người ta đã ứng dụng sản xuất vaccin quai bị. Đặc điểm của quai bị khi nuôi cấy trong tế bào là thường tạo nên tế bào không lồ nhiều nhân.

- Sự nhân lên: Quá trình tổng hợp ARN xảy ra trong nhân của tế bào. Protein cấu trúc và các thành phần khác của virus được tổng hợp tại bào tương. Sau đó quá trình lắp ráp các hạt virus được thực hiện ở bào tương và giải phóng theo phương thức nảy chồi có lấy một phần màng tế bào chủ thực hiện sắp xếp tạo hạt virus hoàn chỉnh.

3.2. Khả năng gây bệnh

- Ổ tuyến mang tai, chúng sinh sản và phát triển; tiếp theo, chúng gây nhiễm trùng huyết và các tuyến khác: tinh hoàn, buồng trứng, tuyến tụy, tuyến giáp hoặc não.

3.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Nước bọt.

+ Máu.

+ Nước tiểu.

- Chẩn đoán trực tiếp :

+ Phân lập virus.

- Chẩn đoán gián tiếp

+ Kết hợp bỏ thể, ức chế ngưng kết hồng cầu hoặc trung hòa.

+ ELISA tìm kháng thể IgG IgM.

4. SARS- CoV-2

4.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc: giống với *Coronavirus*, có đường kính từ 80-120 nm, có gai nhú nhưng không có các glycoprotein loại haemagglutinin. Virus SARS chứa ARN.

- Sức đề kháng:

+ Tồn tại được nhiều giờ ở bên ngoài cơ thể (mặt bàn, mặt thủy tinh, nhựa, tay vịn).

+ Sống được 4 ngày trong phân, sống được 3 tuần lễ ở 0°C.

+ Bị tiêu diệt bởi các hoạt chất ức chế có clo trong 5 phút.

- Nuôi cấy: Có mặt trong đường hô hấp 96h và mất 6 ngày để phân lập và nuôi cấy trong tế bào dòng Vero E6 và Huh -7.

- Sự nhân lên: Virus lây lan qua các giọt nhỏ trong không khí do ho hoặc hắt hơi xâm nhập qua mũi, miệng hoặc mắt của những người ở gần. Các virus trong những giọt này di chuyển nhanh chóng vào đường mũi và đến màng nhầy ở phía sau cổ họng, gắn vào một thụ thể đặc biệt trong các tế bào. Virus corona có các protein gai đâm ra từ bề mặt của chúng, và các gai này bám vào màng tế bào, cho phép vật liệu di truyền virus xâm nhập tế bào người. Khi các bản sao của virus nhân lên, chúng bùng phát và lây nhiễm các tế bào lân cận. Các triệu chứng thường bắt đầu ở phía sau cổ họng với đau họng và ho khan.

4.2. Khả năng gây bệnh

- Tổn thương viêm lan toả, thâm nhiễm đơn nhân phổi kẽ.

- Có xuất huyết ở trung tâm ổ viêm.

- Có các mảnh vỡ hoại tử đường hô hấp.

- Các tổn thương đường hô hấp có thể do SARS-COV 2 , nhưng cũng có thể do cytokin hoặc cả hai.

4.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Dịch tỵ hầu

+ Đờm

+ Dịch mũi

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Phân lập virus bằng tế bào Vero. SARS-COV2 gây thoái hoá tế bào. Sau đó xác định bằng kính hiển vi điện tử hoặc PCR. Nếu kết quả âm tính chưa thể loại trừ SARS.

+ Phản ứng chuỗi trùng hợp polymerase (PCR). Kết quả âm tính không loại trừ được SARS.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Bệnh phẩm là huyết thanh. Có thể phát hiện IgM vào ngày thứ 10 hoặc IgG vào ngày 21 của bệnh. Có thể sử dụng phản ứng trung hoà virus, nhưng nguy hiểm hơn vì dùng trực tiếp virus.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 10. VIRUS LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TIÊU HÓA

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày đặc điểm sinh học của lây truyền qua đường tiêu hóa: virus bại liệt, virus Rota.
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus bại liệt, virus Rota.
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của virus bại liệt, virus Rota.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Virus bại liệt

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc

Bệnh bại liệt được gây bởi virus bại liệt Polio (Poliovirus), đây là virus họ đường ruột (Enterovirus), thuộc họ Picornaviridae. Virus bại liệt gồm 3 tuýp, cả 3 tít đều có nguy cơ gây bệnh, đó là:

- Tuýp 1: có tên gọi là Brunhilde, là nguyên nhân gây bệnh chính, chiếm 90% tất cả các trường hợp.
- Tuýp 2: tên gọi là Lansing
- Tuýp 3: tên gọi là Leon.

Về cấu tạo, virus bại liệt khi nhìn dưới kính hiển vi điện tử có khối hình cầu, trọng lượng phân tử 6.8×10^6 dalton, không có vỏ, đường kính 27 nm gồm 1 protein capsid có cấu trúc bền vững bao lấy ARN của virus.

- **Sức đề kháng:** Virus bại liệt có khả năng tồn tại tốt ở môi trường bên ngoài. Trong nước, ở nhiệt độ thường, virus bại liệt sống được 2 tuần. Trong nhiệt độ 0 - 4 độ C, chúng sống được nhiều tháng. Virus bại liệt chịu được nhiệt độ khô hanh, liều clo thường dùng để diệt khuẩn nước không tiêu diệt được virus bại liệt. Tuy nhiên chúng bị tiêu diệt bởi thuốc tím (KMnO₄) và nhiệt độ 56 độ C sau 30 phút.

- **Nuôi cấy:** Virus bại liệt có thể nuôi cấy trên các tế bào tiên phát như: tế bào thận khỉ Macacus Rhesus, tế bào thận người, tế bào màng ối người hoặc các tế bào thứ phát như: tế bào Hela, tế bào KB. Trong đó, nuôi cấy tốt nhất là tế bào vỏ thận khỉ.

- Sự nhân lên: Ở những người không có miễn dịch, virus từ đường ruột xâm nhập vào cơ thể, nhân lên, gây bệnh và tiếp tục lây nhiễm cho những người xung quanh. Đôi khi, virus có thể lây truyền qua đường máu, nhưng không bao giờ lây nhiễm qua côn trùng trung gian. Thời kỳ ủ bệnh có thể dao động từ 3-5 ngày, đôi với các trường hợp có dấu hiệu liệt thực thể thường kéo dài 7-14 ngày. Thời kỳ lây truyền có thể kéo dài trong thời gian virus còn tồn tại trong cơ thể và đào thải ra ngoài. Lây truyền có thể xuất hiện trước các triệu chứng lâm sàng 7-10 ngày. Sau khi vào cơ thể, virus bại liệt sẽ đến hạch bạch huyết, một số ít virus sẽ xâm nhập vào hệ thống thần kinh trung ương gây tổn thương tế bào vận động của vỏ não và tế bào sừng trước tủy sống,

1.2. Khả năng gây bệnh

- Thể điển hình:

+ **Nung bệnh:** thời gian khoảng 5-6 ngày. Thời kỳ này không có triệu chứng gì rõ rệt.

+ **Khởi phát:** trung bình 2 - 3 ngày.

Bệnh nhân có thể sốt 38 - 40°C nhưng không có co giật và rét run.

Đau ở vùng sắp bị liệt.

+ **Toàn phát:**

Bệnh nhân xuất hiện liệt tối đa 48 giờ.

Đặc điểm: liệt mềm.

+ **Di chứng:** bệnh bại liệt thường để lại di chứng tùy mức độ khác nhau:

Cơ thoái hoá, teo nhỏ.

Xương nhỏ không phát triển.

Tàn tật vĩnh viễn.

- Thể không điển hình:

Thể này không biểu hiện liệt, bệnh nhân chỉ có triệu chứng nhẹ về tiêu hoá, hô hấp, dễ bỏ qua. Đây là thể rất quan trọng về mặt dịch tễ học, vì là nguồn lây lan khó phát hiện để phòng ngừa. Số người bị thể này trong vụ dịch có thể gấp 100 lần thể có triệu chứng lâm sàng.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Phân.

+ Máu tĩnh mạch.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Phân lập virus.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Phản ứng kết hợp bổ thể, phản ứng trung hoà và phản ứng ELISA.

2. Rotavirus

2.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ Virus có hình khối tròn, đường kính trung bình 65-70 nm. Acid nucleic là ARN hai sợi, nằm ở trung tâm hạt virus, đường kính 38 nm và được bao bọc bởi hai lớp capsid. Các capsome của lớp trong xếp theo hình nan hoa và kéo nối với các capsome của lớp ngoài tạo nên hình vòng. Do vậy, các virus này mới có tên là Rota (rota = wheel, bánh xe).

- Sức đề kháng:

+ Virus bị bất hoạt nhanh chóng khi bị xử lý bằng EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Chúng dễ bị bất hoạt ở pH nhỏ hơn 3 hoặc lớn hơn 10, nhưng có sức đề kháng tốt đối với Clo và ether; chúng bền vững sau nhiều ngày trong phân ở nhiệt độ thường.

- Nuôi cấy

Rotavirus có thể được nuôi cấy trên tế bào tiên phát như: tế bào ruột, tế bào thai người, tế bào thai lợn ... Tuy nhiên tỷ lệ virus gây nhiễm giảm dần và bị mất đi sau 2-5 lần cấy truyền.

- Sự nhân lên:

+ Virus vào cơ thể nhân lên chủ yếu ở niêm mạc tá tràng. Người ta đã cấy truyền virus trên hàng loạt các loại tế bào tiên phát như: tế bào ruột và bào thai người, thận bào thai lợn... nhưng tỷ lệ virus gây nhiễm giảm dần và bị mất đi sau 2 đến 5 lần cấy truyền.

2.2. Khả năng gây bệnh

- Virus độc lực xâm nhập vào cơ thể qua đường tiêu hoá và nhân lên chủ yếu ở niêm mạc tá tràng, chúng phá huỷ lớp tế bào trụ, làm lớp tế bào này bị biến dạng. Vì vậy dẫn đến quá trình hấp thu của ruột bị giảm, do đó làm ứ đọng các chất trong lòng ruột, đặc biệt là carbohydrat; làm áp suất thẩm thấu tăng, kéo nước ra ngoài, gây ỉa chảy nhiều lần trong ngày và phân rất nhiều nước.

- Giai đoạn ủ bệnh ngắn, chỉ 1-2 ngày kể từ khi virus xâm nhập vào cơ thể. Sau đó chuyển sang giai đoạn toàn phát với các triệu chứng sau: Ỉa chảy nhiều lần trong ngày, phân nhiều nước; rất hiếm khi có máu và đây là đặc điểm quan trọng để chẩn đoán phân biệt với ỉa chảy do vi khuẩn. Đôi khi, bệnh nhân có nôn, trên lâm sàng biểu hiện mất nước nặng. Bệnh nhân thường sốt nhẹ. Bệnh thường gặp ở trẻ dưới 12

tháng và bệnh thường xảy ra vào mùa thu đông.

2.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

- + Lấy phân bệnh nhân trong tuần lễ đầu của bệnh hoặc hút dịch tá tràng
- + Lấy máu tĩnh mạch bệnh nhân và chất lấy huyết thanh.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi điện tử để phát hiện độ lớn, hình thái và cấu trúc của hạt virus. Để phát hiện virus trực tiếp từ bệnh phẩm, người ta dùng các kỹ thuật miễn dịch như miễn dịch enzym (ELISA), miễn dịch phóng xạ, miễn dịch huỳnh quang, ngưng kết hồng cầu thụ động, ngưng kết hạt latex.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Phản ứng ELISA, phản ứng huỳnh quang, miễn dịch phóng xạ và phản ứng kết hợp bổ thể đã được dùng để tìm kháng thể trong máu bệnh nhân.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 11. VIRUS DẠI (Rabies virus)

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày đặc điểm sinh học của virus dại.
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus dại.
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của virus dại.
- Trình bày nguyên tắc phòng bệnh virus dại và cách xử trí đúng khi bị chó/ mèo nghi dại cắn.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Virus dại

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ Hình gây giống như hình đầu viên đạn, cấu trúc đối xứng hình xoắn, chứa ARN một sợi âm có hình dáng lượn sóng, bao quanh có lớp capsid và lớp envelop chứa protein. Chiều dài của hạt virus dao động trong khoảng 140-300 nm, đường kính khoảng 70 nm. Virus dại cố định ngắn hơn virus dại hoang dại và thường có hình cầu, đường kính khoảng 60 nm.

- Sức đề kháng:

+ Virus có thể bị bất hoạt bởi dung môi hoà tan lipid như: ether, natri desoxycholat, trypsin, formalin. Ánh sáng mặt trời, tia cực tím nhanh chóng làm bất hoạt virus. Môi trường kiềm cao hoặc acid mạnh cũng tác dụng tiêu diệt virus. Virus bị chết ở nhiệt độ 56°C trong 30 phút, ở 80°C sau 3 phút.

+ Virus dại bền vững ở môi trường có glycerol, phenol 0,5%. pH tối ưu của môi trường để bảo quản virus là 7,4-9,0. Với nhiệt độ -40°C trong các mẫu não, virus tồn tại vài tháng và ở -70°C có thể tồn tại hàng năm mà vẫn không mất tính chất gây bệnh.

- Nuôi cấy:

+ Có thể nuôi cấy virus dại trên các tế bào nuôi tiên phát như: tế bào thận chuột đất, tế bào xơ phôi gà và trên các tế bào thường trực như: tế bào vero, tế bào thận chuột đất BHK-21. Khi cấy virus vào phôi gà ấp 7 ngày, vào túi lòng đỏ hay túi

niệu đêm, hiệu giá tối đa của virus được nhận thấy vào ngày thứ 9, các phôi chậm phát triển nhưng ít khi chết. Nhiều động vật máu nóng như chuột nhắt, thỏ, chuột lang... cũng có thể được dùng để nuôi cấy virus.

+ Sự nhân lên: Bệnh dại được lây truyền qua nước bọt của động vật mắc bệnh bài tiết ra ngoài và theo vết cắn, vết liếm, vết xước trên da bị rách (hoặc qua màng niêm mạc còn nguyên vẹn) vào cơ thể, từ đó theo dây thần kinh đến các hạch và thần kinh trung ương. Virus thường nhiễm vào tế bào cơ gần điểm xâm nhập trước, ở đó chúng có thể nhân bản mà không bị hệ miễn dịch của vật chủ chú ý. Khi đã đủ số lượng, virus bắt đầu bám vào thụ thể acetylcholine tại ngã giao thần kinh cơ. Khi đến thần kinh trung ương, vi rút nhân bản trong nơron vận động và cuối cùng lên não. Sau khi nhiễm vào não, virus lần lượt phân tán đến hệ thần kinh ngoại biên và hệ thần kinh tự chủ, sau đó tới tuyến nước bọt, nơi chúng sẵn sàng để nhiễm sang vật chủ kế tiếp. Tại thời điểm này, thần kinh chưa bị tổn thương đáng kể vì thế nhìn bề ngoài con vật vẫn bình thường nhưng nước bọt đã có vi rút dại. Sau đó, vi rút dại hủy hoại dần các tế bào thần kinh làm xuất hiện các triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh dại.

1.2. Khả năng gây bệnh

- *Thời kỳ ủ bệnh*: thay đổi từ 1-3 tháng, nhưng cũng có trường hợp chỉ có 10 ngày hoặc lâu tới 8 tháng. Thời kỳ ủ bệnh dài hay ngắn là tùy thuộc vào vị trí và mức độ vết cắn: Vết cắn càng gần thần kinh trung ương, vết cắn càng sâu thì thời gian ủ bệnh càng ngắn. Thời kỳ ủ bệnh nói chung yên lặng, đôi khi sốt nhẹ, nhức đầu, khó chịu, buồn nôn hoặc chảy nước mắt nước mũi. Dấu hiệu có giá trị chẩn đoán nhất ở thời kỳ này là dấu hiệu kiến bò tại vết cắn.

- *Thời kỳ toàn phát*: người bệnh bị kích thích trên mọi giác quan dẫn đến kết quả là sợ nước, sợ gió, sợ tiếng động và ánh sáng. Các cơ co thắt mạnh dẫn đến đau đớn, trong đầu bệnh nhân có cảm giác bị đè nén, sợ hãi, lo âu sau đó hưng phấn và cuối cùng đến giai đoạn liệt. Tất cả các bệnh nhân dại khi lên cơn đều bị chết trong tình trạng bị liệt cơ hô hấp và tuần hoàn.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- *Bệnh phẩm*: Rất ít làm vì lấy bệnh phẩm khó khăn và không có ý nghĩa trong điều trị. Có các phương pháp chẩn đoán sau:

- *Tìm tiêu thể Negri*: Đối với chó nghi dại, mổ lấy não nhuộm tiêu bản tìm thể Negri, đó là những tiêu thể do virus gây biến đổi tế bào bắt màu eosin, kích thước 0,25-25nm.

- *Phân lập virus*: Bệnh phẩm là nước dãi người hoặc chó lúc đang mắc bệnh hoặc não

khi đã chết. Não phải được giữ trong dung dịch glycerol nguyên chất, trung tính và vô khuẩn. Tiêm truyền bệnh phẩm và não chuột mới đẻ, sau 7- 8 ngày chuột xuất hiện liệt mềm.

- Chẩn đoán huỳnh quang tìm kháng nguyên: Có thể lấy nước dãi hoặc não của bệnh nhân hay súc vật bị đại phết lên tiêu bản. Virus (kháng nguyên) sẽ được phát hiện bằng nhuộm kháng thể gắn huỳnh quang đã biết.

1.4. Nguyên tắc phòng bệnh và điều trị

- Phòng bệnh:

+ Cần tiêu diệt những động vật bị đại hoặc nghi đại. Trong số những động vật máu nóng thì chó là động vật bị nhiễm đại nhiều, mặt khác chó lại sống gần người do đó cần:

+ Hạn chế nuôi chó.

+ Nuôi chó phải xích hoặc nhốt không cho chạy rông ra đường.

+ Tiêm vaccin phòng đại cho chó, mỗi năm 1 lần vào mùa xuân trước khi bệnh đại có thể phát triển mạnh.

- Điều trị:

Nguyên tắc điều trị dự phòng

+ Đối với người bị chó dại cắn hoặc mèo dại cắn, cào chúng ta phải:

* Tiêm kháng huyết thanh chống đại (SAR) dưới da, phía trên vết cắn trong vòng 72 giờ với liều lượng 0,2-0,5 ml, tương đương với 40 đơn vị cho 1 kg cân nặng.

* Sau đó 1-2 ngày, tiêm vaccin phòng đại. Tùy vaccin mà có cách tiêm và liều lượng khác nhau.

* Hiện nay có 2 loại vaccin phòng đại:

Loại vaccin chết là Semple.

Loại vaccin sống giảm độc lực như: Fuenzalida và Verorab.

* Khi bị chó nghi đại cắn, chúng ta phải bình tĩnh thực hiện đầy đủ các bước sau:

* Nhốt chó lại cho ăn uống đầy đủ, theo dõi trong vòng 10 ngày.

* Xử lý vết cắn ở người bằng cách: Rửa sạch vết thương bằng nước xà phòng đặc 20% hoặc dung dịch Bensal konium clorua 20% hoặc dung dịch β -propiolacton 20%. Không khâu vết thương. Gây tê tại chỗ bằng procain.

* Nếu vết cắn ở vào chỗ nguy hiểm (gần đầu, sâu) thì tiêm ngay huyết thanh kháng đại rồi tiếp tục tiêm vaccin phòng đại.

* Nếu vết cắn bình thường (xa đầu, nông) thì theo dõi chó: Nếu sau 10 ngày chó vẫn sống, ăn uống bình thường, thì không cần tiêm vaccin; nếu trong vòng 10 ngày, chó bị chết thì phải tiêm huyết thanh và vaccin ngay.

* Trường hợp chó chạy mất tích, bị đánh chết hoặc bị chó con cắn thì phải tiêm huyết thanh và vaccin ngay vì dấu hiệu dại ở chó con không rõ ràng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 12. VIRUS DENGUE (*Dengue virus*)

MỤC TIÊU

* Kiến thức

- Trình bày đặc điểm sinh học của virus *Dengue*.
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus *Dengue*.
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của virus *Dengue*.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

NỘI DUNG

1. Virus Dengue

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ Virus dengue hình cầu, đối xứng hình khối, chứa một sợi ARN dương với khối lượng phân tử là $3,8.10^6$ Dalton. Vỏ envelop là lipoprotein, capsid được cấu thành bởi 32 capsomer. Đường kính có kích thước khoảng 35-50 nm. Tỷ lệ ARN/Protein/lipid/glucid bằng 6/66/17/9, tỷ lệ này có thể thay đổi chút ít do kỹ thuật tinh chế và loại tế bào virus xâm nhiễm.

- Sức đề kháng:

+ Virus dengue nhạy cảm với các dung môi hoà tan lipid như ether, natri desoxycholat, formalin... dưới tác dụng của tia cực tím, virus bị phá huỷ dễ dàng. Ở 60°C, virus bị tiêu diệt sau 30 phút, ở 4°C bị tiêu diệt sau vài giờ, nhưng nếu ở trong dung dịch glycerol 50% hay đông lạnh bảo quản ở -70°C thì virus có thể sống được vài tháng tới vài năm.

- Nuôi cấy:

+ Có thể nuôi virus dengue trên các tế bào nuôi như Hela, KB, đặc biệt là tế bào muỗi C6/36. Virus dengue dễ dàng nhân lên trong não chuột nhắt trắng 1-3 ngày tuổi, virus phát triển làm cho chuột bị liệt từ ngày thứ 3 trở đi. Người ta còn nuôi cấy virus vào cơ thể muỗi *Toxorhynchites* hoặc *Aedes aegypti*.

- Sự nhân lên: Virus Dengue xâm nhập vào các tế bào bạch cầu tác động lên các neuron thần kinh não và tủy xương gây thoái hóa tế bào gan, thận, tim. Gây tổn thương nội tâm mạc dạ dày, niêm mạc ruột... và hệ thần kinh trung ương. Tổn thương hệ

tuần hoàn làm giãn mao mạch, phù nề quanh mạch máu. Phức hợp miễn dịch xuất hiện sau khi nhiễm virus Dengue thứ phát vài ngày gây vón tụ tiểu cầu, hoạt hóa bổ thể và các yếu tố đông máu. Giải phóng yếu tố tăng tính thấm thành mạch gây shock phản vệ.

1.2. Khả năng gây bệnh

- Khả năng gây bệnh cho động vật

Virus dengue nhân lên rất tốt ở chuột nhắt trắng mới đẻ (1-3 ngày tuổi) khi gây nhiễm vào não và ổ bụng. Nhiễm trùng thể ẩn có thể gây được ở một số loài khỉ.

- Khả năng gây bệnh cho người

Khi muỗi mang virus dengue đã đủ thời gian nung bệnh đốt người, virus xâm nhập qua vết đốt vào máu gây bệnh sốt xuất huyết. Tùy theo số lượng virus vào cơ thể mà thời gian nung bệnh khác nhau (từ 2 đến 15 ngày). Bệnh khởi phát đột ngột, nổi cơn rét run, sốt cao 39-40°C, đau đầu, đau mình mẩy, đặc biệt đau nhiều ở vùng lưng, các khớp xương, cơ và nhãn cầu... ban dát sần hoặc thể tinh hồng nhiệt có thể xuất hiện vào ngày thứ 3 hoặc thứ 5, từ ngực thân mình rồi lan ra các chi và mặt.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Bệnh nhân: lấy 2-4 ml má trong giai đoạn sốt chưa quá 4 ngày kể từ cơn sốt đầu, có chất chống đông.

+ Tử thi, lấy tổ chức gan, lách, hạch lympho... cần lấy ngay sau khi chết chưa quá 6 giờ, được bảo quản trong glycerin 50%.

+ Vectơ: Bắt 20-40 con muỗi *A. aegypti*.

+ Bệnh phẩm được bảo quản lạnh, riêng muỗi giữ cho sống, ghi rõ tên, tuổi, giới tính, số bệnh phẩm, địa chỉ, ngày phát bệnh, ngày vào viện, ngày lấy bệnh phẩm và những dấu hiệu lâm sàng chính rồi gửi ngay tới phòng xét nghiệm.

+ Lấy máu bệnh nhân ngay từ khi bệnh nhân mới vào viện, gọi là máu 1; sau đây 7 ngày, lấy máu lần 2, gọi là máu 2. Để máu đông, chiết lấy phần huyết thanh; huyết thanh được bảo quản ở -20°C cho tới khi làm xét nghiệm.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Phân lập virus.

+ Định loại virus.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Kỹ thuật ngăn ngưng kết hồng cầu.

+ Kỹ thuật kết hợp bổ thể.

+ Kỹ thuật trung hoà.

- + Kỹ thuật ELISA (MAC ELISA phát hiện IgM chẩn đoán sớm)
- + Kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp.
- + Kỹ thuật thẩm phát hiện nhanh kỹ thuật IgM và IgG trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 13. CÁC VIRUS VIÊM GAN (*Hepatitis viruses*)

MỤC TIÊU

* Kiến thức

- Trình bày đặc điểm sinh học của virus viêm gan: A,B, C.
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus viêm gan: A,B, C.
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của viêm gan: A,B, C.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập

NỘI DUNG

1. Virus viêm gan A

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ Viêm gan A là virus chứa ARN một sợi, protein capsid được tạo bởi 32 capsomers tạo đối xứng khối đa giác đều. Kích thước khoảng 27 nm. ARN của virus được cấu tạo bởi 8000 đến 8100 nucleotid, trọng lượng phân tử khoảng $2,8 \times 10^6$ dalton. Protein cấu trúc được cấu tạo từ VP₀ đến VP₄. Virus viêm gan A không có cấu trúc lipid nên chúng đề kháng với ether, acid và các dung môi hoà tan lipid khác.

- Sức đề kháng:

+ Virus viêm gan A vững bền ở nồng độ ether 20% và ở 4°C trong 18 giờ, ở 37°C sau 72 giờ, 60°C/1 giờ. Ở -20°C virus viêm gan A có thể sống hàng năm.

+ Virus bị bất hoạt ở 100°C/5 phút đun sôi, formalin nồng độ 1/4000 ở nhiệt độ 37°C virus có thể tồn tại 3 ngày.

+ Hấp ướt 121°C/20 phút, sấy khô 180°C/1 giờ.

+ Ở pH từ 0 đến 8, virus không bị bất hoạt.

- Nuôi cấy: Tổ chức nuôi cấy tế bào một lớp nguyên phát khi.

+ Tế bào thận thai khi.

+ Tế bào chuyển dạng của phôi khi.

- Sự nhân lên: Virus HAV nhân lên trong nguyên tương tế bào gan, tế bào bị xâm nhiễm giải phóng hạt virus vào máu gây nhiễm virus máu rồi được thải qua mật vào trong phân. HAV có thể nhân lên ở nhiều tổ chức nuôi cấy tế bào khác.

1.2. Khả năng gây bệnh

- Virus viêm gan A chỉ gây bệnh cho người, nhưng có thể gây bệnh thực nghiệm trên

khi mũi nhỏ, có vết ở nam Mỹ và tinh tinh.

- Quá trình gây bệnh ở người: đường lây truyền của HAV qua đường tiêu hóa khi ăn phải các thức ăn có nhiễm phân chứa HAV. Thời kỳ ủ bệnh thường từ 20 tới 30 ngày nhưng sớm nhất là 15 ngày, dài nhất 45 ngày. Sau đó, các triệu chứng thường xuất hiện không rầm rộ với sốt nhẹ (dễ bỏ qua): vàng da, mệt mỏi, chán ăn, đi tiểu vàng, phân nhạt màu trong thời gian ngắn hay không rõ ràng. Khoảng 60% các trường hợp HAV triệu chứng không điển hình. Bệnh thường gây thành dịch.

- Cơ chế gây bệnh:

+ Virus xâm nhập qua đường tiêu hóa, nhân lên trong bào tương tế bào biểu mô đường tiêu hóa rồi vào máu gây nhiễm virus huyết thoáng qua; sau đó vào gan, mật, đôi khi cả lách, gây tổn thương tế bào, làm tăng enzym transaminase trong máu. Virus đào thải qua phân suốt thời kỳ tiền vàng da và vàng da. Virus viêm gan A không có trạng thái người lành mang virus và không tạo thành bệnh mạn tính. Rất hiếm khi gây bệnh thể cấp tính nặng. Tỷ lệ tử vong thấp.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Bệnh phẩm:

+ Phân.

+ Mảnh sinh thiết gan.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Cũng có thể chứng minh sự có mặt của HAV bằng kính hiển vi điện tử hay miễn dịch huỳnh quang hoặc miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA).

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Có thể tìm thấy IgM từ giai đoạn tiền triệu bằng phản ứng ELISA. IgG cũng tìm được sớm và khó tìm được sự gia tăng 4 lần của IgG trong máu lần thứ hai. Vì ngay từ những ngày đầu hiệu giá kháng thể kháng HAV lớp IgM cũng đã rất cao, do vậy, người ta thường dùng phản ứng ELISA tìm IgM. Tìm IgG bằng các phản ứng kết hợp bổ thể, trung hòa, miễn dịch phóng xạ, miễn dịch điện di, ELISA...

2. Virus viêm gan B

2.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ HBV được xếp trong họ *Hepadnaviridae*. HBV là virus mang ADN hai sợi không khép kín, có trọng lượng phân tử 2×10^6 dalton, được cấu tạo bởi 3200 nucleotid, capsid có đối xứng hình khối, kích thước khoảng 27 nm, bao capsid dày khoảng 7 nm được cấu tạo bởi 3 protein cấu trúc: P lớn, P trung bình và P nhỏ; bao tạo cho virus có hình cầu đường kính 42 nm (đó là hạt Dane).

- Sức đề kháng:

+ HBV vững bền với ether 20%, natri desoxycholat; ở 4°C vững bền 18 giờ; 50°C/ 30' không bắt hoạt HBV; 60°C/1giờ cũng không bắt hoạt nhưng 60°C/10 giờ chỉ bắt hoạt một phần. HBV bị bắt hoạt ở 100°C/5phút, Formalin 1/4000 và 37°C/72 giờ. Riêng kháng nguyên HBsAg ở -20°C tồn tại 20 năm.

- Nuôi cấy: Virus HBV chưa nuôi cấy được trên tổ chức nuôi cấy tế bào, virus có thể sao chép được trên tế bào gan người

- Sự nhân lên:

+ Sự nhân lên các thành phần cấu trúc của HBV có thể thực hiện trên tế bào người, động vật là khi, vượn và một số động vật mới sinh. Sự nhân lên của HBV có qua giai đoạn tạo ARN trung gian (ADN → ARN → ADN).

2.2. Khả năng gây bệnh

- HBV gây bệnh cho người lây lan bởi đường máu qua nhiều phương thức: truyền máu, tiêm chích, tình dục, mẹ truyền cho con.

- Sau nhiễm trùng, thời gian ủ bệnh trung bình là 50 tới 90 ngày, có thể 30 tới 120 ngày. Bệnh cảnh lâm sàng thường cấp tính, nhưng không tạo dịch mà chỉ tản mạn với sốt, vàng da, vàng mắt, mệt mỏi.

2.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Sự xuất hiện các dấu ấn của HBV ở các giai đoạn bệnh khác nhau:

Giai đoạn bệnh	HBsAg	HBeAg	ADN Polyme-rase	Anti HBsAg	Anti HBeAg	Anti HBcAg (IgM)	Anti HBeAg	Nhiễm virus máu
Ủ bệnh	+	±	±	-	-	-	-	+++
Cấp tính	+	+	+	-	+C	+T	-	+++
Chuyển sang mạn tính hoạt động	+	+	+	-	+C	+T/V	-	+++
Mạn tính trung gian	+	-	-	-	+T	+T	±	++
Mang HBsAg không lâm sàng	+	-	-	-	+V/T	±T	±	+
Bắt đầu hồi phục	+	-	-	+	+V/T	+C/V	±	+
Hồi phục hoàn toàn	-	-	-	+	+V	+V/T	±	?
Sau hồi phục	-	-	-	+	+T	+T	±	-
Một năm sau hồi phục	-	-	-	+	+T	-	-	-

Sau tiêm phòng hoặc nhiều năm sau nhiễm trùng	-	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---

Ghi chú: C: Hiệu giá cao (10^{-1} -> 10^{-6}); V: Hiệu giá trung bình (vừa) (10^{-3} -> 10^{-4}); T: Hiệu giá thấp (10^{-2} -> 10^{-3}).

- Phác đồ chẩn đoán phân biệt tối thiểu các bệnh viêm gan:

Viêm gan cấp tính	Viêm gan mạn tính
HBsAg	HBsAg
Anti HBcAg (IgM) (có thể chuẩn độ)	Chuẩn độ Anti HBcAg (có thể IgM hoặc IgG)
HBeAg (+), Anti- HBeAg (-)	Khi HBsAg dương tính có thể ở giai đoạn cấp hoặc mạn nhưng đây là giai đoạn lây truyền mạnh

Ghi chú: Ag = kháng nguyên

Có thể sử dụng kỹ thuật ELISA, PCR.

3. Virus viêm gan C

3.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ HCV là virus chứa ARN sợi đơn, xoắn; được cấu tạo bởi khoảng 9033 nucleotid, có enzym sao chép ngược. ARN của HCV có khoảng 3 đoạn gen. Vỏ bao capsid của HCV được cấu tạo bởi protein và lớp bao ngoài cấu tạo bởi lipid do đó dễ bị bất hoạt bởi ether và chloroform. HCV có thể được phân biệt với nhau bởi các nucleotid khác nhau: có ít nhất là 2 typ có cấu trúc kháng nguyên khác nhau và không có phản ứng chéo giữa kháng nguyên của 2 typ

- Sức đề kháng: Yếu, dễ dàng bị tiêu diệt bởi dung môi hòa tan lipid

- Nuôi cấy: Nuôi cấy tế bào một lớp nguyên phát khi. Tế bào thận thai khi. Tế bào chuyển dạng của phôi khi.

- Sự nhân lên: virus viêm gan C tiếp cận, gắn lên bề mặt của màng tế bào gan rồi tiến hành hòa màng. Tiểu thể của virus viêm gan C với lớp vỏ nucleocapsid sẽ chui vào bên trong bào tương của tế bào gan người. phân tử HCV-RNA (RNA của virus viêm gan C) thoát ra khỏi lớp vỏ nucleocapsid rồi di chuyển đến hệ thống lưới nội bào tương của tế bào gan, tại đây diễn ra quá trình dịch mã và tổng hợp nên các phân tử protein của virus viêm gan C, đây là quá trình sao chép tổng hợp nên các phân tử HCV-RNA mới. Sau đó virus viêm gan C sẽ đóng gói, tạo nên các tiểu thể virus viêm gan C hoàn chỉnh và thoát ra khỏi tế bào gan.

3.2. Khả năng gây bệnh

- Thời gian ủ bệnh, sau khi nhiễm virus chủ yếu qua đường truyền máu, rất khác

nhau. Thời gian từ 14 ngày tới 3 - 4 tháng, dài nhất 21 tuần và ngắn nhất 4, 5 ngày. Sau khi nhiễm virus thì 95% số người có triệu chứng lâm sàng không rõ ràng. Chỉ khoảng 5% bệnh nhân có rối loạn tiêu hóa và chủ yếu là mệt mỏi với các tổn thương ở tế bào gan, ở cả bào tương và ở nhân.

- Đối tượng bị bệnh ở mọi lứa tuổi và trở thành mạn tính từ 50% đến 70%. Từ khi nhiễm virus tới khi có kháng thể kháng HCV khoảng 10 - 15 tuần (50%); có thể sớm hơn hoặc muộn hơn. Hầu hết có tăng enzym transaminase. Sau khi bị bệnh, thể mạn tính có thể dẫn tới xơ gan hoặc ung thư gan.

3.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Hiện nay chưa phân lập được virus mà chủ yếu phải tìm kháng thể kháng HCV bằng kỹ thuật ELISA hoặc RIBA (kỹ thuật thấm miễn dịch) và nhiều kỹ thuật khác, có thể sinh thiết tế bào gan để tìm tổn thương ở bào tương hoặc nhân tế bào cùng với dấu hiệu tăng enzym transaminase, PCR.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 14. VIRUS GÂY HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH Ở NGƯỜI (HIV)

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày đặc điểm sinh học của virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (HIV/AIDS).
- Trình bày khả năng gây bệnh của virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (HIV/AIDS).
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (HIV/AIDS).

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập

NỘI DUNG

1. Đặc điểm sinh học Retroviridae

1.1. Lịch sử phát hiện

Năm 1981, ở Los-Angeles, California và New York phát hiện một số người đồng tính luyến ái đều bị suy giảm miễn dịch mắc phải nên tên bệnh "AIDS" (hay SIDA) xuất hiện. Đến tháng 5 năm 1983, nhóm virus học của viện Pasteur Paris (L. Montagnier, J. Barre - Sinoussi) và 1984, nhóm tác giả của Viện Ung thư quốc gia Bethesda, Hoa Kỳ (M. Popovic, P.C. Gallo) cũng phân lập được virus từ bệnh nhân AIDS. Tháng 10/1984, khi phân tích genom của hai virus trên người ta thấy chúng cơ bản giống nhau và đều là tác nhân gây AIDS.

Năm 1986, Hội nghị quốc tế đã thống nhất gọi virus gây bệnh AIDS là HIV (Human Immunodeficiency Virus - virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người).

1.2. Phân loại HIV

HIV thuộc họ Retroviridae. Họ virus này là tác nhân gây ung bướu ở động vật và người gọi chung là Oncovirinae, trong đó có nhóm Lentivirus gây nhiễm trùng chậm, gồm 3 loại: HIV-1, HIV-2 gây AIDS ở người và SIV gây suy giảm miễn dịch ở khỉ.

1. Có 2 typ là HIV1 và HIV2: khác nhau về vùng phân bố và kháng nguyên
2. Nhóm, Subtyp và subsubtyp:

HIV1 chia thành 3 nhóm : M, O, N.

- Nhóm O và N hiếm gặp.

- Nhóm M phổ biến nhất, đa dạng, gây bệnh chủ yếu và lây lan nhanh ở cộng đồng,

- Nhóm M chia thành 10 subtyp: A, B, C, D, E, F, G, H, J và K.

Tỷ lệ gây bệnh của các subtyp: C= 47%; A=27%; B=12,3%; D=5,3%;

CRF01_AE=3,2%

Đường lây cũng liên quan đến subtyp: VD. Thailand B chội ở nhóm lây đồng tiêm chích, E chội ở nhóm lây đường tình dục

• Mỗi typ lại phân thành subsubtyp; A1, A2 (thuộc subtyp A); F1, F2 (thuộc typ F).

• Dạng tổ hợp typ, VD: CRF01_AE (hỗn hợp giữa typA và E)

1. HIV

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ HIV có dạng hình cầu với đường kính khoảng 100 – 120 nm. bao quanh là các gai nhú.

+ HIV có đặc điểm chung của họ *Retroviridae*. Hạt virus hoàn chỉnh (virion) có cấu trúc gồm 3 lớp:

- *Lớp vỏ ngoài (vỏ envelop)*: Lớp này là một màng lipid kép có kháng nguyên chéo với màng sinh chất tế bào. Gắn lên màng này là các gai nhú. Đó là các phân tử glycoprotein có trọng lượng phân tử 160 kilodalton (viết tắt: gp 160). Gai nhú bao gồm hai phần:

Glycoprotein màng ngoài có trọng lượng phân tử là 120 kilodalton (gp 120). Gp120 là kháng nguyên dễ biến đổi nhất, gây khó khăn cho phản ứng bảo vệ cơ thể và chế vắc xin phòng bệnh.

Glycoprotein xuyên màng có trọng lượng phân tử 41 kilodalton (gp 41).

- *Vỏ trong (vỏ capsid)*, vỏ này bao gồm 2 lớp protein:
- *Lớp ngoài* hình cầu, cấu tạo bởi protein có trọng lượng phân tử là 18 kilodalton (p18)
- *Lớp trong* hình trụ không đều, cấu tạo bởi các phân tử protein có trọng lượng phân tử là 24 kilodalton (p 24), Đây là kháng nguyên rất quan trọng để chẩn đoán HIV/AIDS sớm và muộn.
- *Lõi của HIV*: gồm genom và các enzym

- Sức đề kháng:

+ Cũng giống như các virus khác có lớp vỏ ngoài là lipid, HIV dễ dàng bị bất hoạt bởi các yếu tố vật lý, hóa chất và nhiệt độ. Trong dung dịch nó bị phá hủy ở

56°C sau 20 phút, ở dạng đông khô nó bị mất hoạt tính ở 68°C sau 2 giờ. Với các hóa chất như hypoclorit, glutaraldehyd, ethanol, hydrogen peroxid, phenol, paraformaldehyd, HIV nhanh chóng bị bất hoạt (nó dễ bị mất khả năng gây nhiễm hơn HBV).

- Nuôi cấy:

+ HIV nuôi cấy tốt trên tế bào lympho người (đã được kích thích phân bào) và tế bào thường trực Hela có CD4+.

- Sự nhân lên: Virus HIV không thể tự phát triển hoặc sinh sản khi đi vào cơ thể, virus HIV tự gắn vào CD4 sau đó hợp nhất với nó. HIV sử dụng chính chất liệu di truyền của tế bào bạch cầu để nhân lên, sinh sôi và nảy nở, quá trình cứ vậy tiếp diễn. Tế bào CD4 có chức năng chống lại các tác nhân gây bệnh cho cơ thể.

1.2. Khả năng gây bệnh: HIV phá hủy các tế bào của hệ miễn dịch, khiến cơ thể không còn khả năng chống lại các virus, vi khuẩn và nấm gây bệnh. Do đó bệnh nhân dễ bị một số loại ung thư và nhiễm trùng cơ hội mà bình thường có thể đề kháng được. Đây là một bệnh mạn tính do HIV gây ra.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật:

- Bệnh phẩm:

+ Máu.

+ Huyết thanh.

- Chẩn đoán trực tiếp:

+ Phát hiện kháng nguyên protein p24 của HIV-1 (HIV-1 p24 Assay).

+ Phản ứng khuếch đại chuỗi Polymerase (PCR: polymerase chain reaction).

+ Phương pháp hóa miễn dịch tổ chức.

+ Phân lập HIV.

- Chẩn đoán gián tiếp:

+ Kỹ thuật ngưng kết Latex nhanh (Serodia).

+ Kỹ thuật miễn dịch enzym pha rắn (ELISA).

+ Kỹ thuật thấm miễn dịch của Western Blot (WB).

TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 15. HUMAN PAPILLOMA VIRUS

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

- Trình bày đặc điểm sinh học của Human Papilloma Virus.
- Trình bày khả năng gây bệnh của Human Papilloma Virus.
- Kể tên các phương pháp chẩn đoán của Human Papilloma Virus.
- Trình bày nguyên tắc phòng bệnh virus Human Papilloma Virus.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Thể hiện được tính tích cực trong học tập, tự học, tìm kiếm thông tin, tổng hợp kiến thức nhằm phát triển năng lực cho bản thân.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập

NỘI DUNG

1. Human Papilloma virus (HPV)

1.1. Đặc điểm sinh học

- Hình thể và cấu trúc:

+ Virus có AND hai sợi vòng, không có envelop, có đối xứng hình khối, đường kính: 50-55nm.

- Sức đề kháng: Sức đề kháng yếu, dễ bị bất hoạt bởi các tác nhân vật lý, hóa học như nhiệt độ cao, acid, kiềm, dung môi hòa tan lipid

- Nuôi cấy: Khó nuôi cấy

- Sự nhân lên: Sự nhân lên của HPV phụ thuộc vào cơ chế phiên mã của tế bào biểu mô da hoặc niêm mạc

1.2. Khả năng gây bệnh:

- HPV có thể gây ra các tổn mụn cóc và mụn com (wart) trên da và trên đường sinh dục.

- HPV gây nhiễm theo đường niệu dục có thể gây tổn thương thanh quản trẻ em (nhiễm trùng theo đường sinh dục)

- Các typ HPV 16, 18 thường đóng vai trò quan trọng trong ung thư cổ tử cung, dương vật, âm đạo.

- Polyoma có thể gây nhiễm trùng đường hô hấp trên ở mức độ trung bình ở những bệnh nhân đã bị suy giảm miễn dịch.

1.3. Chẩn đoán vi sinh vật

- Phương pháp huyết thanh học thường không thể xác định một cách đầy đủ. Có thể sử dụng những phương pháp khác như kính hiển vi điện tử hoặc kỹ thuật gen, đặc

biệt là PCR và lai tại chỗ rất có giá trị.

Loại xét nghiệm

- Tế bào học
- PCR
- Miễn dịch huỳnh quang hoặc peroxidase
- Kính hiển vi điện tử
- Nuôi cấy

Xác định

- Hình dạng tế bào bị tổn thương (Koilocytotic cells)
- AND của virus
- Kháng nguyên virus
- Virus
- Không có ý nghĩa

1.4. Phòng bệnh và điều trị

Phòng bệnh

- Tiêm ngừa vắc xin phòng HPV: Tại Việt Nam đang lưu hành vắc xin phòng ung thư cổ tử cung, âm hộ, âm đạo, các tổn thương tiền ung thư và loạn sản, mụn cóc sinh dục và bệnh lý do nhiễm virus HPV. Vắc xin được chỉ định tiêm cho nữ giới từ 9 – 26 tuổi, bất kể đã từng quan hệ tình dục hay chưa. Ngoài ra, các bé trai trong độ tuổi dậy thì cũng có thể tiêm loại vắc xin này để phòng ngừa nguy cơ nhiễm HPV dẫn tới ung thư vòm họng, ung thư miệng, lưỡi, ung thư đường sinh dục nam giới (hậu môn, dương vật,...).
- Quan hệ tình dục an toàn, tránh việc quan hệ với nhiều bạn tình cùng lúc.
- Phụ nữ nên làm xét nghiệm Pap/Thinprep/HPV DNA định kỳ hàng năm hoặc mỗi 3 năm để phát hiện sớm những thay đổi bất thường ở cổ tử cung – dấu hiệu tiền ung thư.
- Nam và nữ nên dừng quan hệ tình dục ngay khi biết hoặc nghĩ mình mắc bệnh sùi mào gà, sau đó cần đi khám và điều trị triệt để.
- Tầm soát sức khỏe định kỳ để phát hiện sớm tổn thương do nhiễm virus HPV.

Điều trị

- Trong nhiều trường hợp, tình trạng nhiễm HPV sẽ tự khỏi mà không cần điều trị gì. Trên thực tế, khoảng 70 – 90% người nhiễm HPV được hệ thống miễn dịch loại bỏ virus khỏi cơ thể.
- Khi cần điều trị, mục tiêu làm giảm triệu chứng bằng cách loại bỏ mụn cóc cũng như các tế bào bất thường trong cổ tử cung. Hướng điều trị thường là:
 - + Phẫu thuật lạnh: Làm đông lạnh mụn cóc bằng nitơ lỏng.
 - + Quy trình cắt bỏ phẫu thuật điện vòng (LEEP): Sử dụng một vòng dây đặc biệt để loại bỏ các tế bào bất thường.
 - + Đốt điện: Đốt mụn cóc bằng dòng điện.

+ Liệu pháp laser: Sử dụng ánh sáng cường độ cao để tiêu diệt mụn cóc và các tế bào bất thường.

+ Thuốc bôi: Bôi kem thuốc trực tiếp lên mụn cóc (lưu ý không sử dụng các phương pháp điều trị mụn cóc không được kê đơn trên bộ phận sinh dục).

TỰ LƯỢNG GIÁ

PHẦN THỰC HÀNH

Bài 16. KỸ THUẬT PHA CHẾ MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị đủ phương tiện cần thiết và tiến hành pha chế các loại môi trường dùng cho việc phân lập và xác định từng loại vi khuẩn.
- Nhận định các môi trường sau khi pha chế và giải thích các nguyên nhân làm môi trường không đạt yêu cầu.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

1. Môi trường cơ bản

Môi trường cơ bản là môi trường có đủ các chất cần thiết cho đa số các loại vi khuẩn gây bệnh phát triển được. Môi trường này thường được dùng để nuôi cấy các vi khuẩn dễ phát triển.

1.1. Môi trường thạch thường

1.1.1. Chuẩn bị

* Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu
- + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh
- + Đĩa petri vô khuẩn

* Hóa chất: Nước cất hoặc nước RO

- + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

* Môi trường:

- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.
- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn

hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.

1.1.2. Tiến hành theo Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH THƯỜNG

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa petri vô khuẩn
	Chuẩn bị hóa chất		- Hóa chất: Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	- Môi trường thạch thường - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.
4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 25 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.

5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	25 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Điều kiện PH tối ưu cho vi khuẩn phát triển	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, không quá nóng và không đông vón.
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn	Môi trường không bị nhiễm khuẩn	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.

	sinh học.		
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Đảm bảo chất lượng của môi trường	Môi trường đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường/ túi zip và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
14	Lưu kết quả	Lưu kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	- Kết quả được lưu vào sổ/phần mềm

1.1.3. Các bước cần lưu ý

* Nhận định kết quả kỹ thuật.

Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng thạch phải được đảm bảo.
- Dụng cụ phải vô khuẩn.
- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ âm.

1.1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

1.1.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH THƯỜNG

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa petri vô khuẩn - Hóa chất: Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%		
	Chuẩn bị hóa chất			
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	- Môi trường thạch thường - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 25 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.		
5	Cân môi trường	25 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.		

	môi trường bằng đĩa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.			
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: 7,4 ± 0,2		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121 ⁰ C x 15 phút		
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn 50-60 ⁰ C thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, không quá nóng và không đông vón.		
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.		
11	Nhận định kết quả	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.		
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Môi trường đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường/ túi zip và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân		

		loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
--	--	---	--	--

1.2. Môi trường canh thang

1.2.1. Chuẩn bị

*** Dụng cụ, hóa chất**

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh

+ Ống nghiệm vô khuẩn

*** Hóa chất**

+ Nước cất hoặc nước RO

+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

+ Máu cừu vô khuẩn

*** Môi trường, sinh phẩm**

- Tên môi trường: Brain Heart Infusion Broth

- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.

- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tơi, xốp, không vón cục.

1.2.2. Tiến hành theo Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG CANH THANG

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)

2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Ống nghiệm vô khuẩn - Hóa chất + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%
	Chuẩn bị hóa chất		
3	<p>Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường</p> <p>Kiểm tra chất lượng môi trường</p>	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Môi trường canh thang - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toí, xộp, không vón cục.
4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 37 gam môi trường để pha 1 lít môi trường canh thang.
5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	37 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đĩa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có vàng và đủ thể tích 1000ml.
	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm	Điều kiện PH tối ưu	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$

7	tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	cho vi khuẩn phát triển	
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121 ⁰ C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn 50-60 ⁰ C thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có màu vàng, trong không có vẩn đục, không quá nóng.
10	Đổ môi trường vào ống nghiệm vô khuẩn - Xếp ống nghiệm vô khuẩn trong tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng ống nghiệm khoảng 2 ml. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Môi trường không bị nhiễm khuẩn	Ống nghiệm được vào giá để ống nghiệm và mỗi ống nghiệm đổ 2 ml.
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Môi trường có màu vàng, trong và không có vẩn đục.
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Đảm bảo chất lượng của môi trường	Môi trường được đóng gói 10 ống môi trường/ túi và để theo chiều thẳng đứng và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay

1.2.3. Các bước cần lưu ý

- Nhận định kết quả kỹ thuật: Môi trường có màu vàng, trong và không có vẩn đục.

- Các sai số và cách khắc phục.
 - + Chất lượng thạch phải được đảm bảo.
 - + Dụng cụ phải vô khuẩn.
 - + Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
 - + Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ lạnh.

1.2.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

1.2.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG CANH THANG

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Ống nghiệm vô khuẩn - Hóa chất + Nước cất hoặc nước RO		
	Chuẩn bị hóa chất	+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi	- Môi trường canh thang - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường		

	trường	cân pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tươi, xốp, không vón cục.		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 37 gam môi trường để pha 1 lít môi trường canh thang.		
5	Cân môi trường	37 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có vàng và đủ thể tích 1000ml.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút		
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Môi trường có màu vàng, trong không có vẩn đục, không quá nóng.		
10	Đổ môi trường vào ống nghiệm vô khuẩn - Xếp ống nghiệm vô khuẩn trong tủ an toàn sinh học	Ống nghiệm được vào giá để ống nghiệm và mỗi ống nghiệm đổ 2 ml.		

	- Đổ môi trường vào từng ống nghiệm khoảng 2 ml. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.			
11	Nhận định kết quả	Môi trường có màu vàng, trong và không có vẩn đục.		
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Môi trường được đóng gói 10 ống môi trường/ túi và để theo chiều thẳng đứng và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
14	Lưu kết quả	- Kết quả được lưu vào sổ/phần mềm		

2. Môi trường phong phú

Môi trường phong phú là môi trường có nhiều chất dinh dưỡng hoặc các vitamin và một số yếu tố phát triển khác. Môi trường này dùng để nuôi cấy vi khuẩn không hoặc khó phát triển trên các môi trường thông thường.

2.1. Môi trường thạch máu

1.2.1. Chuẩn bị

* Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh

+ Ống nghiệm vô khuẩn

* Hóa chất

+ Nước cất hoặc nước RO

+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

+ Máu cừu/ máu thỏ vô khuẩn

* Môi trường, sinh phẩm

- Tên môi trường: thạch máu cơ sở
- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.
- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.

2.1.2. Tiến hành theo Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH MÁU

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa Petri vô khuẩn
	Chuẩn bị hóa chất, phẩm		- Hóa chất + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20% + Máu cừu vô khuẩn
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	- Môi trường thạch máu cơ sở - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn

			sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.
4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 40 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.
5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	40 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Điều kiện PH tối ưu cho vi khuẩn phát triển	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, không quá nóng và không đông vón.
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn và để nguội - Khi nhiệt độ khoảng 50°C , cho máu thỏ hoặc máu cừu vô khuẩn vào lắc đều và nhẹ nhàng cho máu	Môi trường vô khuẩn	Môi trường đồng nhất, không đông vón, có màu đỏ tươi. Môi trường có độ dày khoảng 3,5 đến 4 mm, bề mặt nhẵn, không đông vón

	<p>và môi trường trộn đều.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Đổ môi trường vào đĩa petri 25 ml môi trường vào 1 đĩa petri. Để đĩa petri ở trên mặt phẳng, không bị nghiêng . - Để nguội 		<p>và có màu đỏ tươi.</p> <p>Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học cho đến khi đông chặt.</p>
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu đỏ tươi của máu.
12	Đóng gói môi trường đông lại	Đảm bảo chất lượng của môi trường	Môi trường đông lại trong tủ an toàn sinh học, khi đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.
13	<p>Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rửa tay 	Đảm bảo an toàn sinh học	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay

2.1.3. Các bước cần lưu ý

* Nhận định kết quả kỹ thuật: Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu đỏ tươi của máu.

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng thạch phải được đảm bảo.
- Dụng cụ phải vô khuẩn.
- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ âm.

2.1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

2.1.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH MÁU

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa Petri vô khuẩn - Hóa chất + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20% + Máu cừu vô khuẩn		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	- Môi trường thạch máu cơ sở - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tơi, xốp, không vón cục.		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 40 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.		

5	Cân môi trường	40 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút		
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, không quá nóng và không đông vón.		
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn và để nguội - Khi nhiệt độ khoảng 50°C , cho máu thỏ hoặc máu cừu vô khuẩn vào lắc đều và nhẹ nhàng cho máu và môi trường trộn đều. - Đổ môi trường vào đĩa petri 25 ml môi trường vào 1	Môi trường đồng nhất, không đông vón, có màu đỏ tươi. Môi trường có độ dày khoảng 3,5 đến 4 mm, bề mặt nhẵn, không đông vón và có màu đỏ tươi. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học cho đến khi đông chặt.		

	đĩa petri. Để đĩa petri ở trên mặt phẳng, không bị nghiêng . - Để nguội			
11	Nhận định kết quả	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu đỏ tươi của máu.		
12	Đóng gói môi trường đông lại	Môi trường đông lại trong tủ an toàn sinh học, khi đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C.		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		

3. Môi trường phân lập

3.1. Môi trường *macconkey*

3.1.1. Chuẩn bị

* Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh

+ Ống nghiệm vô khuẩn

* Hóa chất

+ Nước cất hoặc nước RO

+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

* Môi trường, sinh phẩm

- Tên môi trường: *macconkey*

- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.

- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tối, xốp, không vón cục.

3.1.2. Tiến hành theo quy trình kỹ thuật

**QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH
MACCONKEY**

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa petri vô khuẩn
	Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm.		- Hóa chất, sinh phẩm + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	- Môi trường Macconkey - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tơi, xốp, không vón cục.
4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 51,5 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.
5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	51,5 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.

6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có màu hồng và đủ thể tích 1000ml.
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Điều kiện PH tối ưu cho vi khuẩn phát triển	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, có màu hồng, không quá nóng và không đông vón.
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Môi trường không bị nhiễm khuẩn	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu hồng.

12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
----	--	--------------------------	--

3.1.3. Các bước cần lưu ý

* Nhận định kết quả kỹ thuật: Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, có màu hồng.

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng thạch phải được đảm bảo.
- Dụng cụ phải vô khuẩn.
- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ ấm.

3.1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

3.1.5. Lượng giá: bảng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH MACCONKEY

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu		
	Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500		

		ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa petri vô khuẩn - Hóa chất, sinh phẩm + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	- Môi trường Macconkey - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tơi, xốp, không vón cục		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 51,5 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.		
5	Cân môi trường	51,5 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đĩa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có màu hồng và đủ thể tích 1000ml.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút		

9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn 50-60°C thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, có màu hồng, không quá nóng và không đông vón.		
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.		
11	Nhận định kết quả	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, có màu hồng nhạt.		
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		

3.2. Môi trường chapmann

3.2.1. Chuẩn bị

* Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh

+ Ống nghiệm vô khuẩn

* Hóa chất

+ Nước cất hoặc nước RO

+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

* Môi trường, sinh phẩm

- Tên môi trường: *Chapmann*

- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.

- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.

3.2.2. Tiến hành theo Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG SCHAPMANN

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Ống nghiệm vô khuẩn
	Chuẩn bị hóa chất, thuốc thử		- Hóa chất, thuốc thử + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	- Môi trường Chapman - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục

4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 111 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.
5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	111 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Điều kiện PH tối ưu cho vi khuẩn phát triển	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có dạng lỏng màu hồng, đồng đều, không quá nóng và không đông vón.
10	Đổ môi trường vào ống nghiệm vô khuẩn và để nguội - Ống nghiệm xếp vào giá ống nghiệm và đổ 2 ml môi trường vào từng ống nghiệm. - Sau đó để giá ống	Môi trường vô khuẩn	Môi trường thạch ống có màu hồng, mặt nghiêng có chiều dài 2,5 đến 3 cm, không có phần chân. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học cho đông hoàn toàn.

	<p>nghiệm nghiêng 1 góc 30°, sao cho mặt nghiêng của môi trường có chiều dài 2,5 đến 3 cm, thạch ống không có phần chân.</p>		
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Môi trường có màu hồng đồng nhất, không cứng hoặc quá mềm, mặt nghiêng 2,5 đến 3 cm, không có chân.
12	Đóng gói môi trường đông lại	Đảm bảo chất lượng của môi trường	Để môi trường trong tủ an toàn sinh học, đến khi đông chặt thì đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C
13	<p>Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải</p> <p>- Rửa tay</p>	Đảm bảo an toàn sinh học	<p>- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định.</p> <p>- Thực hiện đúng 6 bước rửa tay</p>

3.2.3. Các bước cần lưu ý

* Nhận định kết quả kỹ thuật: Môi trường có màu hồng đồng nhất, không cứng hoặc quá mềm, mặt nghiêng 2,5 đến 3 cm, không có chân.

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng thạch phải được đảm bảo.
- Dụng cụ phải vô khuẩn.
- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ âm.

3.2.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

3.2.5. Lượng giá: bảng bảng kiểm

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG SCHAPMANN

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Ống nghiệm vô khuẩn		
	Chuẩn bị hóa chất, thuốc thử	- Hóa chất, thuốc thử + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	- Môi trường Chapman - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 111 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.		
5	Cân môi trường	111 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		

6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đũa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút		
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Môi trường có dạng lỏng màu hồng, đồng đều, không quá nóng và không đông vón.		
10	Đổ môi trường vào ống nghiệm vô khuẩn và để nguội - Ống nghiệm xếp vào giá ống nghiệm và đổ 2 ml môi trường vào từng ống nghiệm. - Sau đó để giá ống nghiệm nghiêng 1 góc 30° , sao cho mặt nghiêng của môi trường có chiều dài 2,5 đến 3 cm, thạch ống không có phần chân.	Môi trường thạch ống có màu hồng, mặt nghiêng có chiều dài 2,5 đến 3 cm, không có phần chân. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học cho đông hoàn toàn.		
11	Nhận định kết quả	Môi trường có màu hồng đồng nhất, không cứng hoặc quá mềm, mặt nghiêng 2,5 đến 3 cm, không có chân.		
12	Đóng gói môi trường đông lại	Để môi trường trong tủ an toàn sinh học, cho đến khi đông chặt		

		thì đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ 2-5 ⁰ C		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		

4. Môi trường xác định

Môi trường xác định là loại môi trường trong đó ngoài những chất dinh dưỡng cần thiết còn có một số chất dùng để nghiên cứu những đặc tính sinh vật hóa học nhằm xác định các loại vi khuẩn gây bệnh.

Môi trường UTI agar

4.1. Chuẩn bị

* Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh

+ Ống nghiệm vô khuẩn

* Hóa chất

+ Nước cất hoặc nước RO

+ NaOH 20%; dung dịch HCl 20%

* Môi trường, sinh phẩm

- Tên môi trường: *UTI agar*

- Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha.

- Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục.

4.2. Tiến hành theo Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH UTI

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng,

		Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức 500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa Petri vô khuẩn - Chuẩn bị hóa chất + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%
	Chuẩn bị hóa chất		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	Tránh nhầm lẫn, kỹ thuật tiến hành thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Môi trường thạch UTI bột - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, tơi, xốp, không vón cục
4	Kiểm tra công thức pha chế	Tránh nhầm lẫn	Trên nhãn môi trường: 56,3 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.
5	Cân môi trường	Đủ lượng môi trường	56,3 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đĩa thủy tinh hoặc	Đúng số lượng và thể tích	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.

	viên khuấy từ.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Điều kiện PH tối ưu cho vi khuẩn phát triển	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$
8	Hấp vô khuẩn	Môi trường vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn $50-60^{\circ}\text{C}$ thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	Đảm bảo an toàn	Môi trường có dạng lỏng đồng đều, không quá nóng và không đông vón.
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Môi trường không bị nhiễm khuẩn	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.
11	Nhận định kết quả	Đảm bảo chất lượng môi trường	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Đảm bảo chất lượng của môi trường	Để môi trường trong tủ an toàn sinh học cho đến khi đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường/ túi zip và được bảo quản ở nhiệt độ $2-5^{\circ}\text{C}$.
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu

			gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
--	--	--	---

4.3. Các bước cần lưu ý

* Nhận định kết quả kỹ thuật: Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng thạch được đảm bảo.
- Dụng cụ phải vô khuẩn.
- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- Bảo quản đúng nhiệt độ trong tủ âm.

4.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật

4.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG THẠCH UTI

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, cân phân tích, máy đo pH, tủ hấp, máy khuấy từ, bình định mức		

	Chuẩn bị hóa chất	500 ml, 1000 ml, đĩa thủy tinh + Đĩa Petri vô khuẩn - Chuẩn bị hóa chất + Nước cất hoặc nước RO + NaOH 20%; dung dịch HCl 20%		
3	Kiểm tra đối chiếu môi trường và chỉ định đồ môi trường Kiểm tra chất lượng môi trường	- Môi trường thạch UTI bột - Kiểm tra chỉ định đồ môi trường: tên môi trường, công thức pha, số lượng môi trường cần pha. - Môi trường được kiểm tra đúng tên môi trường, hạn sử dụng của nhà sản xuất, còn hạn mở nắp, màu trắng đục, toi, xốp, không vón cục		
4	Kiểm tra công thức pha chế	Trên nhãn môi trường: 56,3 gam môi trường để pha 1 lít môi trường thạch thường.		
5	Cân môi trường	56,3 gam môi trường được cân bằng cân phân tích.		
6	Pha môi trường: môi trường đã cân được cho vào bình cầu 1000 ml, sau đó cho 1/3 lượng nước cất hoặc nước RO để hòa tan môi trường bằng đĩa thủy tinh hoặc viên khuấy từ.	Môi trường được hòa tan hoàn toàn, đồng nhất, có trắng đục và đủ thể tích 1000ml.		
7	Điều chỉnh PH Dùng máy đo PH để kiểm tra. Nếu Acid thì thêm NaOH 20%, nếu kiềm thêm HCl	Dung dịch môi trường có PH: $7,4 \pm 0,2$		
8	Hấp vô khuẩn	Nhiệt độ 121°C x 15 phút		
9	Để nguội khi hấp đạt đủ thời	Môi trường có dạng lỏng đồng		

	gian, xả van để giảm hết áp suất, chờ nhiệt độ nồi áp suất còn 50-60°C thì mở nắp nồi hấp lấy bình đựng môi trường ra.	đều, không quá nóng và không đông vón.		
10	Đổ môi trường vào đĩa petri vô khuẩn - Xếp đĩa petri vô khuẩn vào vào tủ an toàn sinh học - Đổ môi trường vào từng đĩa khoảng ứng 25 ml cho đĩa đường kính 9 cm. Để nguội ở nhiệt độ phòng trong tủ an toàn sinh học.	Đĩa petri được xếp theo hàng, thẳng không nghiêng và độ dày của mỗi đĩa là khoảng 3,5 đến 4 mm, môi trường thạch đồng đều, bề mặt nhẵn, không bị đông vón. Để nguội để thạch đông hoàn toàn.		
11	Nhận định kết quả	Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày hoặc mỏng quá, màu trắng đục.		
12	Đóng gói và bảo quản môi trường	Để môi trường trong tủ an toàn sinh học cho đến khi đông chặt thì đóng gói 10 đĩa môi trường/ túi zip và được bảo quản ở nhiệt độ 2-5°C.		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		

Bài 17. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN *STAPHYLOCOCCUS*

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng**

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập *Staphylococcus* gây bệnh thường gặp.
- Tiến hành phân lập *Staphylococcus* theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán *Staphylococcus*.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm

NỘI DUNG

1. Tiêu chuẩn chẩn đoán Tụ cầu (*Staphylococcus*)

1.1. *S. aureus*

- Khuẩn lạc: trên môi trường thạch máu tạo khuẩn lạc dạng S (tròn lồi nhẵn bóng), tan máu β . Trên môi trường thạch thường tạo khuẩn lạc dạng, có sắc tố màu vàng chanh.
- Hình thể: cầu khuẩn gram (+), xếp thành từng đám hình chùm nho.
- Catalase (+)
- Coagulase (+)
- Lên men đường malnitol trong môi trường chapmann
- Protein A (+)

1.2. *S. epidermidis*

- Khuẩn lạc: trên môi trường thạch máu tạo khuẩn lạc dạng S (tròn lồi nhẵn bóng), không tan máu. Trên môi trường thạch thường tạo khuẩn lạc dạng.
- Hình thể: cầu khuẩn gram (+), xếp thành từng đám hình chùm nho.
- Catalase (+)
- Coagulase (-)
- Không lên men đường malnitol trong môi trường chapmann
- Protein A (-)
- Nhạy với novobiocin

1.3. *S. saprophyticus*

- Khuẩn lạc: trên môi trường thạch máu tạo khuẩn lạc dạng S (tròn lồi nhẵn bóng),

không tan máu. Trên môi trường thạch thường tạo khuẩn lạc dạng.

- Hình thể: cầu khuẩn gram (+), xếp thành từng đám hình chùm nho.
- Catalase (+)
- Coagulase (-)
- Không lên men đường malnitol trong môi trường chapmann
- Protein A (-)
- Kháng với novobiocin

2. Quy trình nuôi cấy phân lập

1.2.1. Chuẩn bị phương tiện

- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu
- + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.
- Chuẩn bị môi trường, hóa chất:
- Chuẩn bị môi trường, hóa chất:
- + Môi trường thạch thường, thạch máu, thạch chapmann.
- + Bộ nhuộm gram, H₂O₂, huyết tương cừu vô khuẩn, Kháng huyết thanh *S. aureus*, cồn sát khuẩn, cồn 90°
- Bệnh phẩm:
- + Tùy theo từng bệnh do tụ cầu mà lấy bệnh phẩm thích hợp như mủ vết thương, mủ mụn nhọt đã vỡ, máu, dịch não tủy, dịch màng bụng, phân, nước tiểu...
- + Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.
- + Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.

2.1.2. Tiến hành

Các nội dung:

* **Nhận xét mẫu xét nghiệm:** theo tiêu chuẩn nhận mẫu, nếu đúng thì sẽ thực hiện các bước tiếp theo, nếu không đạt yêu cầu của tiêu chuẩn nhận mẫu, trả về khoa và lấy lại mẫu.

Tiêu chuẩn loại trừ mẫu

- + Trùng khớp các thông tin trên mẫu bệnh phẩm và chỉ định xét nghiệm
- + Để trong lọ vô khuẩn, có nắp xoáy.
- + Thời gian lấy mẫu đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.
- + Mẫu không bị đổ ra bên ngoài.
- + Số lượng bệnh phẩm đủ để thực hiện xét nghiệm: ít nhất là 0,1 ml.

*** Kỹ thuật nhuộm gram**

+ Nhận định hình thể vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm

+ Lựa chọn môi trường nuôi cấy

+ Kỹ thuật cấy: phân vùng.

- Quy trình chẩn đoán vi khuẩn: giảng viên hướng dẫn mẫu 1 lần để xác định các tính chất sinh vật hóa học dùng để chẩn đoán vi sinh.

Các nội dung:

+ Đọc tính chất khuẩn lạc và nhuộm gram khuẩn lạc

+ Thử nghiệm catalase

+ Thử nghiệm đông huyết tương lam kính- ống nghiệm

+ Thử nghiệm xác định tính chất lên men đường manitol trong môi trường chapmann

+ Thử nghiệm novobiocin

+ Thử nghiệm xác định protiein A

- Chẩn đoán vi sinh vật và phân tích kết quả định danh dựa vào tiêu chuẩn chẩn đoán.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.

	Chuẩn bị hóa chất, môi trường		<ul style="list-style-type: none"> - Chuẩn bị môi trường, hóa chất: + Môi trường thạch thường, thạch máu, thạch chapmann. + Bộ nhuộm gram, H₂O₂, huyết tương cừu vô khuẩn, Kháng huyết thanh <i>S. aureus</i>, cồn sát khuẩn, cồn 90
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi hình thể vi khuẩn.	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gắng tay thấy nóng vừa)</p>
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Vi khuẩn bắt màu đúng	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi

			dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đám.
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Tách được khuẩn lạc riêng rẽ VK mọc	Thạch thường và thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Staphylococcus</i> mọc. KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề tủ ấm 37°C x 18 -24 giờ
8	Đọc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc	Nhận định đúng vi khuẩn	- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 1mm. - Tính chất tan máu: màu vàng kem, tan máu hoàn toàn. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Phân biệt liên cầu và tụ cầu	Thử nghiệm Catalase (+)
10	-Thử nghiệm đông huyết tương lam kính hoặc ống nghiệm	Phân biệt tụ cầu vàng và các tụ cầu khác trong nhóm	- Coagulase (+)

11	Cấy vào môi trường Chapman: cấy vào môi trường thạch ống Độc tính chất lên men đường manitol trong môi trường Chapman.	Phân biệt tụ cầu vàng và các tụ cầu khác trong nhóm	- Cấy môi trường chapmann: cấy mặt nghiêng theo đường zic zắc từ dưới lên trên. - Để trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Lên men đường mannitol
12	Xác định Protein A	Tiêu chuẩn chẩn đoán đặc hiệu <i>S. aureus</i>	Lấy khuẩn lạc thuần 18 -24 giờ để xác định Protein A bằng phản ứng ngưng kết latex. Xuất hiện ngưng kết, Protein A: (+)
13	Nhận định kết quả	Chẩn đoán <i>S. aureus</i>	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
15	Lưu kết quả	Lưu kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	- Kết quả được lưu vào sổ/phần mềm

**QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH
*S. EPIDERMIDIS, S. SAPROPHYTICUS***

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)

2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước. - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: <ul style="list-style-type: none"> + Môi trường thạch thường, thạch máu, thạch chapmann. + Bộ nhuộm gram, H₂O₂, huyết tương cừu vô khuẩn, khoanh Novobiocin. + Cồn sát khuẩn, cồn 90°.
	Chuẩn bị môi trường và sinh phẩm và hóa chất		
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>

5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoan 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi hình thể vi khuẩn.</p>	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoan.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Vi khuẩn bắt màu đúng</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đám.</p>
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.</p>	<p>Tách được khuẩn lạc riêng rẽ VK mọc</p>	<p>Thạch thường và thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Staphylococcus</i> mọc.</p> <p>KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm.</p> <p>Để ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ</p>
8	<p>Đọc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc</p>	<p>Nhận định đúng vi khuẩn</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dạng: S, kích thước 0,5 đến 1mm. - Tính chất tan máu: màu trắng, không tan máu. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).

9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Phân biệt liên cầu và tụ cầu	Thử nghiệm Catalase (+)
10	- Thử nghiệm đông huyết trong lam kính hoặc ống nghiệm	Phân biệt tụ cầu vàng và các tụ cầu khác trong nhóm	- Coagulase (-)
11	Cấy vào môi trường Chapman: cấy vào môi trường thạch ống Đọc tính chất lên men đường manitol trong môi trường Chapmann.	Phân biệt tụ cầu vàng và các tụ cầu khác trong nhóm	- Cấy môi trường chapmann: cấy mặt nghiêng theo đường zig zắc từ dưới lên trên. - Ủ trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Lên men đường mannitol
12	Làm thử nghiệm novobiocin Đọc tính chất novobiocin	Phân biệt <i>S. epidermidis</i> và <i>S. saprophyticus</i>	Cấy đặt khoanh novobiocin: pha huyền dịch 0,5 mc faland (phụ lục). Đúng và đủ thời gian và nhiệt độ
13	Nhận định kết quả	Định danh <i>S. epidermidis</i> và <i>S. saprophyticus</i>	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán - <i>S. epidermidis</i> nhạy với novobiocin (Đường kính ≥16mm) - <i>S. saprophyticus</i> kháng với novobiocin (Đường kính ≤ 12mm)
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
15	Trả kết quả và vào sổ	Trả kết quả xét	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

	lưu	thử nghiệm, quản lý, theo dõi	
--	-----	-------------------------------	--

*** Thử nghiệm catalase:**

- *Nguyên tắc:* Vi khuẩn sinh enzym catalase để thủy phân H₂O₂ thành H₂O và O₂, tạo ra bọt khí. Thử nghiệm này được dùng để phân tích đặc điểm ban đầu của hầu hết các vi khuẩn.

- *Tiến hành*

+ Khởi động tủ ATSH ít nhất 15 phút trước khi thực hiện.

+ Sắp xếp các dụng cụ cần thiết vào tủ ATSH.

+ Chọn một khuẩn lạc (khóm) tách biệt rõ, đã được 18-24 giờ, chuyển sang lam kính sạch.

+ Nhỏ 1 giọt thuốc thử H₂O₂ lên lam kính và quan sát trên nền tối ngay lập tức hiện tượng sủi bọt.

+ Bỏ lam kính vào thùng chứa vật sắc nhọn.

- *Nhận định kết quả:*

+ Test dương tính khi có sủi bọt ngay lập tức.

+ Phản ứng yếu nếu chỉ có 1-2 bóng khí.

+ Phản ứng âm tính khi không có bóng khí hoặc chỉ có một ít bóng khí sau 20 giây.

*** Thử nghiệm đông huyết tương**

- *Nguyên tắc*

Coagulase là chất giống thrombin, có thể chịu nhiệt, có khả năng hoạt hóa fibrinogen thành fibrin, tạo thành cục đông fibrin. Hiện tượng này được biểu hiện trong thử nghiệm hình thành cục đông khi cho vi khuẩn thuộc chi *Staphylococcus* vào huyết tương. Vi khuẩn sinh coagulase tự do, được giải phóng từ tế bào. Ở hầu hết các chủng *S. aureus*, fibrinogen gắn trên bề mặt tế bào gọi là “coagulase liên hợp” hoặc “yếu tố kết cụm”. Nhờ yếu tố này, vi khuẩn có khả năng tác động trực tiếp lên fibrinogen trong huyết tương để gây đông vón trên lam kính.

- *Tiến hành*

Thử nghiệm trên lam kính:

+ Nhỏ 10 µl nước khử ion trên lam kính hoặc tấm nhựa đen.

+ Hòa một vài khuẩn lạc (khóm) vào nước để có một hỗn dịch đục đều.

+ Nhỏ 1-3 µl huyết tương thô và quan sát hiện tượng đông vón xảy ra trong vòng 10 giây.

+ Sau thử nghiệm, bỏ tấm nhựa vào thùng chứa chất thải truyền nhiễm hoặc lam kính vào thùng chứa vật sắc nhọn.

Thử nghiệm trong ống nghiệm:

- + Để ống huyết tương ở nhiệt độ 25°C.
- + Lấy vào ống 1 khuẩn lạc (khóm) của tụ cầu nuôi cấy từ môi trường không ức chế hoặc nhỏ 2 giọt máu từ mẫu cấy máu dương tính.
- + Không lắc ống trong quá trình quan sát, nghiêng nhẹ để phát hiện đông vón.
- + Ủ thêm 20 giờ ở 25°C nếu sau 4 giờ không hình thành đông vón.
- + Ngoài ra có thể để ống ở 35°C và nhỏ 1 hoặc 2 giọt CaCl₂ 5% sau 24 giờ.
- + Nếu đông vón hình thành, vi khuẩn có coagulase.
- + Không có cục đông sau 24 giờ ở 35°C nhưng sau đó nhỏ 1-2 giọt CaCl₂ 5% vào ống thì cục đông hình thành.

- *Nhận định kết quả*

Thử nghiệm trên lam kính

- Thử nghiệm: Dương tính nếu có ngưng kết tế bào vi khuẩn sau khi nhỏ huyết tương.
- Thử nghiệm: Âm tính nếu không có sự ngưng kết.

56

Thử nghiệm trong ống nghiệm

- Thử nghiệm dương tính nếu có 1 trong các tiêu chuẩn sau:
 - + Nếu có đông vón hình thành hoàn toàn hoặc không hoàn toàn trước 24 giờ.
 - + Không có đông vón hình thành sau khi thêm 1-2 giọt CaCl₂ 5% vào ống không có đông vón sau 24 giờ.
 - Thử nghiệm âm tính khi có 1 trong các tiêu chuẩn dưới đây:
 - + Không hình thành cục máu đông sau 24 giờ ở 25°C.
 - + Không có đông vón sau 24 giờ ở 35°C nhưng sau đó nhỏ 1-2 giọt CaCl₂ 5% vào ống thì cục đông hình thành.
- * Lên men đường mannit: nuôi cấy tụ cầu vào môi trường schapman, sau 24-48 giờ tụ cầu gây bệnh sẽ làm cho màu của môi trường chuyển từ màu hồng cánh sen sang màu vàng.

2.1.3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- * Nhận định kết quả kỹ thuật: theo tiêu chuẩn chẩn đoán
- * Các sai số và cách khắc phục.
 - + Chất lượng môi trường thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.
 - + Dụng cụ phải vô khuẩn.

- + Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- + Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.
- + Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.
- + Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.
- + Các kỹ năng thực hiện đúng.

2.1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

2.1.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước. - Chuẩn bị môi trường, hóa chất: + Môi trường thạch thường, thạch máu, thạch chapmann. + Bộ nhuộm gram, H ₂ O ₂ , huyết tương cừu vô khuẩn, Kháng huyết thanh <i>S. aureus</i> , cồn sát khuẩn, cồn 90		
	Chuẩn bị hóa chất, môi trường			
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét		

	<p>bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.</p> <p>- Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm</p>	<p>nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.</p> <p>- Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.</p>		
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>		
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>		
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô</p> <p>Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đám.</p>		
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu.</p> <p>Kỹ thuật cấy phân vùng.</p>	<p>Thạch thường và thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Staphylococcus</i> mọc.</p> <p>KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị</p>		

		nhiễm. Đề ủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ		
8	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc	- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 1mm. - Tính chất tan máu: màu vàng kem, tan máu hoàn toàn. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).		
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Thử nghiệm Catalase (+)		
10	- Thử nghiệm đông huyết trong lam kính hoặc ống nghiệm	- Coagulase (+)		
11	Cấy vào môi trường Chapman: cấy vào môi trường thạch ống Độc tính chất lên men đường manitol trong môi trường Chapmann.	- Cấy môi trường chapmann: cấy mặt nghiêng theo đường zic zắc từ dưới lên trên. - Đề trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Lên men đường mannitol		
12	Xác định Protein A	Lấy khuẩn lạc thuần 18 -24 giờ để xác định Protein A bằng phản ứng ngưng kết latex. Xuất hiện ngưng kết, Protein A: (+)		
13	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán		
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải - Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
15	Lưu kết quả	- Kết quả được lưu vào sổ/phần mềm		

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH
S. EPIDERMIDIS, S. SAPROPHYTICUS

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.		
	Chuẩn bị môi trường và sinh phẩm và hóa chất	- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: + Môi trường thạch thường, thạch máu, thạch chapmann. + Bộ nhuộm gram, H ₂ O ₂ , huyết tương cừu vô khuẩn, khoanh Novobiocin. + Cồn sát khuẩn, cồn 90.		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		
4	Nhuộm gram bệnh phẩm Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính. Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.		
5	Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản	Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều		

	<p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoan 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>hết vùng khoan.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>		
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đám.</p>		
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu.</p> <p>Kỹ thuật cấy phân vùng.</p>	<p>Thạch thường và thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Staphylococcus</i> mọc.</p> <p>KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm.</p> <p>Để ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ</p>		
8	<p>Độc tính chất khuẩn lạc:</p> <p>Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dạng: S, kích thước 0,5 đến 1mm. - Tính chất tan máu: màu trắng, không tan máu. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+). 		
9	<p>Xác định tính chất sinh vật hóa học</p> <p>- Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên</p>	<p>Thử nghiệm Catalase (+)</p>		

	lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.			
10	- Thử nghiệm đông huyết trong lam kính hoặc ống nghiệm	- Coagulase (-)		
11	Cấy vào môi trường Chapman: cấy vào môi trường thạch ống Đọc tính chất lên men đường manitol trong môi trường Chapman.	- Cấy môi trường chapmann: cấy mặt nghiêng theo đường zig zắc từ dưới lên trên. - Để trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Lên men đường mannitol		
12	Làm thử nghiệm novobiocin Đọc tính chất novobiocin	Cấy đặt khoanh novobiocin: pha huyền dịch 0,5 mc faland (phụ lục). Đứng và đủ thời gian và nhiệt độ		
13	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán - <i>S. epidermidis</i> nhạy với novobiocin (Đường kính ≥16mm) - <i>S. saprophyticus</i> kháng với novobiocin (Đường kính ≤ 12mm)		
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng		
15	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 18. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN *STREPTOCOCCUS*

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập *Streptococcus* gây bệnh thường gặp.
- Tiến hành phân lập *Streptococcus* theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán *Streptococcus*.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm

NỘI DUNG

1. Chẩn đoán liên cầu (*Streptococcus*)

* Tiêu chuẩn chẩn đoán nhóm *Streptococcus pyogenes*

- Hình thể và tính chất bắt màu: cầu khuẩn gram (+)
- Hình thái khuẩn lạc và tính chất tan máu trên môi trường thạch máu: khuẩn lạc nhỏ, tan máu β
- Không bị ly giải bởi mật và muối.
- Thử nghiệm optochin (-).
- Catalase (-).
- Nhạy với Bacitracin
- CAMP test (-)
- Kháng huyết thanh *Streptococcus pyogenes* (+)

* Tiêu chuẩn chẩn đoán nhóm *Streptococcus agalactiae*

- Hình thể và tính chất bắt màu: cầu khuẩn gram (+)
- Hình thái khuẩn lạc và tính chất tan máu trên môi trường thạch máu: khuẩn lạc nhỏ, tan máu β
- Không bị ly giải bởi mật và muối.
- Thử nghiệm optochin (-).
- Catalase (-).
- Kháng với Bacitracin
- CAMP test (+)
- Kháng huyết thanh *Streptococcus Streptococcus agalactiae* (+)

*** Tiêu chuẩn chẩn đoán *Streptococcus pneumoniae***

- Hình thể và tính chất bắt màu.
- Khuẩn lạc có đĩnh trên môi trường thạch máu có gentamycin.
- Thử nghiệm optochin (+).
- Bị ly giải bởi muối mật hoặc sắc tố mật.
- Ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu:

2. Chuẩn bị

- Dụng cụ:

- + Lam kính, ống nghiệm.
- + Bơm kim tiêm, tăm bông vô khuẩn, kim chích.
- + Các dụng cụ nhuộm gram.

- Hóa chất:

- + Nước muối sinh lý.
- + Các thuốc nhuộm gram.
- + Khoanh giấy tẩm etyl hydrocuprein để làm thử nghiệm optochin.
- + Khoanh giấy tẩm bacitracin.
- + Mật bò hoặc mật thỏ.

- Môi trường:

- + Môi trường thạch máu.
- + Môi trường canh thang glucose 5%.

- Bệnh phẩm: Tùy từng bệnh mà lấy bệnh phẩm là chất ngoáy họng, mũ vết thương, mũ mụn nhọt, viêm nhiễm ngoài da, dịch màng phổi, nước não tủy, máu, dịch cổ tử cung, nước tiểu.

3.. Tiến hành

Các nội dung:

- + Nhận xét mẫu xét nghiệm
- + Kỹ thuật nhuộm gram
- + Nhận định hình thể vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm
- + Lựa chọn môi trường nuôi cấy
- + Kỹ thuật cấy: phân vùng.
- + Đọc tính chất khuẩn lạc và nhuộm gram khuẩn lạc
- + Thử nghiệm catalase
- + Thử nghiệm Bacitrcin
- + Thử nghiệm Optochin
- + Thử nghiệm CAMP

+ Thử nghiệm xác định protein M

- Chẩn đoán vi sinh vật và phân tích kết quả định danh dựa vào tiêu chuẩn chẩn đoán.

*** QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH
STREPTOCOCCUS SPP TAN MÁU HOÀN TOÀN**

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: + Môi trường thạch máu. + H ₂ O ₂ , cồn sát khuẩn, cồn 90°, Khoanh BA, chủng <i>S. aureus</i> . + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn tuyệt đối.
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	Nhuộm gram bệnh phẩm	Tránh nhầm lẫn và định hướng	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.

	Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dần bệnh phẩm bằng bút dạ.	chẩn đoán	Vùng dần bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.
5	Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm. Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính. Để khô và cố định bằng nhiệt độ	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi hình thể vi khuẩn.	Tiêu bản dần không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh. Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học. Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gắng tay thấy nóng vừa)
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Vi khuẩn bắt màu đúng	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Tách được khuẩn lạc riêng rẽ	Thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Streptococcus</i> mọc. KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Để ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ
8	Đọc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm	Nhận định đúng vi khuẩn	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 mm. - Tính chất tan máu: Tan máu

	khuẩn lạc		hoàn toàn - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Phân biệt liên cầu và tụ cầu	Thử nghiệm Catalase (-)
10	Thử nghiệm CAMP test cấy 1 đường là chủng <i>S. aureus</i> . Chủng cần thử nghiệm cấy vuông góc và cách đường cấy <i>S. aureus</i> Đề trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Đọc kết quả CAMP test	Phân biệt <i>S. pyogenes</i> và <i>S. agalactiae</i>	Chủng <i>S. aureus</i> cấy 1 đường dài 3-4 cm. Chủng cần thử nghiệm cấy 1 đường vuông góc và cách đường cấy <i>S. aureus</i> 2mm Đề trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ. - CAMP test (+): xuất hiện vùng tan máu hoàn toàn hình mũi tên. CAMP test (-): không xuất hiện vùng tan máu hoàn toàn hình mũi tên.
11	Thử nghiệm BA - Khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch. Ria cấy trên môi trường MH máu. Đặt khoanh BA lên chính giữa đĩa môi trường. Đề tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Đọc kết quả thử nghiệm BA	Phân biệt <i>S. pyogenes</i> và <i>S. agalactiae</i>	- Pha đúng huyền dịch 0,5 Mc farland. Cấy dàn đều khuẩn lạc trên môi trường. Đặt khoanh BA đúng giữa môi trường MH máu. Đề 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Đường kính vòng vô khuẩn > 14 mm: nhạy cảm Đường kính vòng vô khuẩn ≤ 14 mm: đề kháng
12	Nhận định kết quả	Kết quả chính	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán

		xác	Liên cầu A: Nhạy với Bacitracin Liên cầu B: CAMP test (+)
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

*** QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH
STREPTOCOCCUS SPP TAN MÁU KHÔNG HOÀN TOÀN**

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: + Môi trường thạch máu. + H ₂ O ₂ , khoanh OP. + Bộ nhuộm gram, cồn sát

			khuẩn, còn tuyệt đối.
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi hình thể vi khuẩn.	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	Vi khuẩn bắt màu đúng	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy còn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi:</p>

			Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Tách được khuẩn lạc riêng rẽ	Thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Streptococcus</i> mọc. KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thừa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ
8	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc	Nhận định đúng vi khuẩn	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 mm, màu xám. - Tính chất tan máu: Tan máu không hoàn toàn - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Phân biệt liên cầu và tụ cầu	Thử nghiệm Catalase (-)

10	<p>Thử nghiệm Optocin (OP)</p> <p>- Thực hiện thử nghiệm OP</p> <p>Khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch. Ria cấy trên môi trường MH máu. Đặt khoanh OP lên chính giữa đĩa môi trường.</p> <p>- Đọc kết quả thử nghiệm OP</p>	<p>Phân biệt <i>S. pneumoniae</i> và <i>S. viridans</i></p>	<p>Pha đúng huyền dịch 0,5 Mc farland. Cấy dàn đều khuẩn lạc trên môi trường. Đặt khoanh OP đúng giữa môi trường MH máu. Ủ 37°C x 18 -24 giờ</p> <p>Đo đường kính vòng vô khuẩn > 14 mm: nhạy cảm</p> <p>Đường kính vòng vô khuẩn ≤ 14 mm: đề kháng</p>
11	<p>Nhận định kết quả</p>	<p>Xác định đúng vi khuẩn</p>	<p>Theo tiêu chuẩn chẩn đoán</p> <p>- <i>S. pneumoniae</i> nhạy với OP</p> <p>- <i>S. viridans</i> kháng OP</p>
12	<p>Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải</p> <p>Rửa tay</p>	<p>Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh</p> <p>Đảm bảo an toàn sinh học</p>	<p>- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định.</p> <p>- Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng</p>
13	<p>Trả kết quả và vào sổ lưu</p>	<p>Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi</p>	<p>Ghi kết quả đầy đủ, chính xác</p>

* Thử nghiệm Bacitracin

- Nguyên tắc

Bacitracin là kháng sinh phân lập được từ *Bacillus subtilis*, ức chế tổng hợp vách tế bào thông qua ức chế quá trình tổng hợp peptidoglycan. SXT ức chế trao đổi folate, ức chế tổng hợp DNA. Liên cầu A nhạy cảm với bacitracin hơn là những liên cầu tan máu β khác. Những nghiên cứu gần đây cho thấy Liên cầu nhóm A nhạy với bacitracin và SXT.

- Tiến hành

- + Lấy thạch máu ủ ấm hoặc để ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện.
- + Lấy 3, 4 khuẩn lạc ria trên thạch máu.
- + Dùng panh gấp khoanh giấy bacitracin và SXT đặt lên vùng đã ria khuẩn lạc.

+ Đặt vào tủ ẩm CO₂ 35 - 37°C trong 18 - 24 giờ.

- Nhận định kết quả

+ Dương tính: nếu có vòng ức chế quanh khoanh hoặc đĩa bacitracin D40 0,04 units, hoặc đường kính vùng ức chế 12mm quanh khoanh D41 0,1 units.

+ Âm tính: không có vòng ức chế.

Mức độ nhạy cảm với Bacitracin	Mức độ nhạy cảm với SXT	Nhận định kết quả
S	R	Liên cầu A
R	R	Liên cầu B
R	S	Không phải liên cầu A và không phải liên cầu B
S	S	Loại trừ liên cầu A và không phải liên cầu B

*** CAMP test**

- Nguyên tắc: *Streptococcus agalactiae* tạo ra một loại protein chịu nhiệt, ngoài tế bào, có thể khuếch tán, tác động hiệp đồng với yếu tố tan máu β do *Staphylococcus aureus* sản xuất ra để tạo thành một vùng ly giải trong môi trường chứa hồng cầu cừu hoặc bò. Protein này tên là yếu tố CAMP (CAMP factor) là từ ghép từ chữ bắt đầu của tên các tác giả bài báo đầu tiên mô tả hiện tượng này. Test CAMP chuẩn dựa vào sự tương tác giữa hai yếu tố này trong quá trình nhân lên của vi khuẩn để tạo nên một vùng trong suốt hình ngọn lửa hay đầu mũi tên tại vùng gặp nhau của hai vi khuẩn này khi chúng được đặt vuông góc với nhau. Test nhanh sử dụng mẫu tách chiết beta-lysin của *Staphylococci* tác dụng trực tiếp với yếu tố CAMP đã khuếch tán vào môi trường chứa khuẩn lạc *S. agalactiae*. Phản ứng CAMP dương tính được xác nhận bằng hiện tượng tan máu tiến triển trong vòng 30 phút sau khi thêm yếu tố CAMP vào. Test này được sử dụng để định danh *S. agalactiae* và nhiều trực khuẩn Gram dương khác bao gồm cả *Listeria monocytogenes*. Phản ứng CAMP đảo ngược là phản ứng trong đó hiện tượng tan máu do beta-hemolysin của *Staphylococci* bị ức chế do sự sản sinh ra phospholipase C hoặc D bởi một số vi khuẩn (ví dụ: *S. agalactiae*, *Listeria*, *Corynebacterium spp.*). Phản ứng dương tính khi có một vùng không tan máu hình thành giữa chỗ tiếp xúc của vi khuẩn đang cần thử với *Staphylococcus*.

Phương pháp chuẩn

- Cấy *S. aureus* ATCC 25923 theo một đường thẳng ở giữa đĩa thạch.

- Ria chủng vi khuẩn chưa biết theo một đường thẳng vuông góc với đường cấy *S. aureus* nhưng không chạm vào đường đó.
- Ria chủng làm chứng dương song song và cách đường ria chủng cần xác định khoảng 1 inch (2,54 cm).
- Đề tên mỗi đường ria vào mặt sau của đĩa.
- Ủ đĩa qua đêm ở 35°C trong tủ ấm có CO₂.

Phương pháp dùng khoan giấy

- Đặt khoan giấy chứa betalysin trên thạch máu đã làm ấm.
- Ria chủng vi khuẩn cách bờ khoan giấy khoảng 2-3 mm.
- Ủ đĩa qua đêm ở 35°C trong tủ ấm có CO₂.

Phương pháp nhỏ giọt nhanh

- Nhỏ 1 giọt thuốc thử (hoặc lấy bằng ống đay 10μl) cạnh khuẩn lạc của *S. agalactiae* trên thạch máu. Dung dịch có thể chạm vào khuẩn lạc.
- Ủ đĩa (nấp ở trên) để tránh giọt thuốc thử chạy ngang qua mặt đĩa, trong 20 phút ở 35°C.
- Kiểm tra bằng đèn soi xem có vùng tan máu cạnh khuẩn lạc không.
- Ủ lại 30 phút nếu phản ứng ban đầu âm tính. Sử dụng kính lúp, nếu cần, để quan sát đĩa.
- Có thể để tủ lạnh sau khi ủ để thúc đẩy phản ứng.

Nhận định kết quả

- Kết quả dương tính trong phương pháp chuẩn: có khoảng tan máu hình đầu mũi tên ở chỗ giao giữa đường ria của *S. aureus* và chủng cần xác định sinh yếu tố CAMP.
- Test CAMP đảo ngược hoặc phospholipase D dương tính: Có khoảng không tan máu hình mũi tên ở chỗ giao cắt của 2 chủng tan máu.
- Nếu sử dụng khoan giấy, kết quả dương tính xác định khi có vùng tan máu hoàn toàn hình trăng lưỡi liềm/hình cung ở chỗ giao giữa beta-lysin và chủng cần xác định.
- Trong test giọt nhỏ nhanh, sự xuất hiện của vùng tan máu rộng ra ở những nơi thuốc thử thấm vào là dương tính.
- Không có vùng tan máu mở rộng ra xung quanh khuẩn lạc thì phản ứng là âm tính.

*** Thử nghiệm optochin**

Streptococcus pneumoniae (phế cầu) là vi khuẩn hay gặp ở đường hô hấp, tính chất tan máu, không thể phân biệt được chúng với các loại cầu khuẩn và

Lactobacilli. Xác định sự nhạy cảm với optochin có thể phân biệt được phé cầu và các cầu khuẩn tan máu α khác. Các vi khuẩn Gram dương, khuẩn lạc giống phé cầu sẽ tạo ra một vòng ức chế rõ ràng xung quanh khoanh optochin, còn những loại vi khuẩn tan máu α khác thì không tạo vòng ức chế.

- Thử nghiệm với khuẩn lạc thuần

- + Dùng que cấy lấy một khuẩn lạc tan máu α riêng rẽ để ria trực tiếp hoặc pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục 0,5 McFarland.
- + Dùng que cấy ria vi khuẩn hoặc tăm bông lấy huyền dịch vi khuẩn ria các đường sát nhau lên đĩa thạch máu, lặp lại ít nhất 2 lần.
- + Dùng panh vô khuẩn đặt một khoanh optochin lên bề mặt thạch máu.
- + Thử nghiệm từ bệnh phẩm.
- + Dùng que cấy vô trùng ria bệnh phẩm lên đĩa thạch máu.
- + Dùng panh vô khuẩn đặt một khoanh optochin vào rìa của vùng nguyên ủy.
- Ấn nhẹ panh xuống khoanh giấy để khoanh giấy bám chắc vào đĩa thạch.
- Để vào tủ ấm 35 - 37°C với 5 -10% CO₂, đọc kết quả sau 18-24 giờ.
- Nếu có đường kính vùng ức chế thì đo bằng thước chia mm hoặc đo bằng thước kẹp (caliper).

Nhận định kết quả

- Thử nghiệm dương tính (nhạy cảm với optochin): Đường kính vùng ức chế $\geq 14\text{mm}$ (15 đến 30mm).
- Nhạy cảm mức trung gian với optochin: Đường kính vùng ức chế $< 14\text{mm}$.
- Đề kháng với optochin: Không có vùng ức chế.
- Những khuẩn lạc nằm trong vùng ức chế có thể là phé cầu hoặc không.

4. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- * Nhận định kết quả kỹ thuật: theo tiêu chuẩn chẩn đoán
- * Nhận định kết quả kỹ thuật: theo tiêu chuẩn chẩn đoán
- * Các sai số và cách khắc phục.
- + Chất lượng môi trường thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.
- + Dụng cụ phải vô khuẩn.
- + Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- + Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.
- + Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.
- + Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.
- + Các kỹ năng thực hiện đúng.

5. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

6. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *STREPTOCOCCUS* *SPP* TAN MÁU HOÀN TOÀN

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước.		
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất	- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: + Môi trường thạch máu. + H ₂ O ₂ , cồn sát khuẩn, cồn 90°, Khoanh BA, chủng <i>S. aureus</i> . + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn tuyệt đối.		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		

4	Nhuộm gram bệnh phẩm Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dần bệnh phẩm bằng bút dạ.	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính. Vùng dần bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.		
5	Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm. Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính. Để khô và cố định bằng nhiệt độ	Tiêu bản dần không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh. Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học. Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gắng tay thấy nóng vừa)		
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.		
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Streptococcus</i> mọc. KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Để ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ		
8	Đọc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 mm. - Tính chất tan máu: Tan máu hoàn		

		toàn - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).		
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Thử nghiệm Catalase (-)		
10	Thử nghiệm CAMP test cấy 1 đường là chủng <i>S. aureus</i> . Chủng cần thử nghiệm cấy vuông góc và cách đường cấy <i>S. aureus</i> Đề trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 - 24 giờ - Đọc kết quả CAMP test	Chủng <i>S. aureus</i> cấy 1 đường dài 3-4 cm. Chủng cần thử nghiệm cấy 1 đường vuông góc và cách đường cấy <i>S. aureus</i> 2mm Đề trong tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ. - CAMP test (+): xuất hiện vùng tan máu hoàn toàn hình mũi tên. CAMP test (-): không xuất hiện vùng tan máu hoàn toàn hình mũi tên.		
11	Thử nghiệm BA - Khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch. Ria cấy trên môi trường MH máu. Đặt khoanh BA lên chính giữa đĩa môi trường. Đề tủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Đọc kết quả thử nghiệm BA	- Pha đúng huyền dịch 0,5 Mc farland. Cấy dàn đều khuẩn lạc trên môi trường. Đặt khoanh BA đúng giữa môi trường MH máu. Đề 37 ⁰ C x 18 -24 giờ - Đường kính vòng vô khuẩn > 14 mm: nhạy cảm Đường kính vòng vô khuẩn ≤ 14 mm: đề kháng		
12	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán Liên cầu A: Nhạy với Bacitracin Liên cầu B: CAMP test (+)		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và		

		phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng		
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

**BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *STREPTOCOCCUS*
SPP TAN MÁU KHÔNG HOÀN TOÀN**

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng (đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng, tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn, đeo thẻ công tác)		
2	Chuẩn bị dụng cụ Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm, bông thấm nước. - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất: + Môi trường thạch máu. + H ₂ O ₂ , khoanh OP. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn tuyệt đối.		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		

4	Nhuộm gram bệnh phẩm Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dần bệnh phẩm bằng bút dạ.	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính. Vùng dần bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.		
5	Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm. Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính. Để khô và cố định bằng nhiệt độ	Tiêu bản dần không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh. Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học. Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gắng tay thấy nóng vừa)		
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.		
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch máu. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Thạch máu là môi trường thích hợp cho <i>Streptococcus</i> mọc. KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng. Đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Để ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ		
8	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, tính chất tan máu, nhuộm khuẩn lạc	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 mm, màu xám. - Tính chất tan máu: Tan máu không		

		hoàn toàn - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu khuẩn gram (+).		
9	Xác định tính chất sinh vật hóa học - Thử nghiệm catalase: lấy 1 khuẩn lạc và nghiền trên lam kính, nhỏ H ₂ O ₂ vào có hiện tượng sủi bọt.	Thử nghiệm Catalase (-)		
10	Thử nghiệm Optocin (OP) - Thực hiện thử nghiệm OP Khuẩn lạc thuần, pha huyền dịch. Ria cấy trên môi trường MH máu. Đặt khoanh OP lên chính giữa đĩa môi trường. - Đọc kết quả thử nghiệm OP	Pha đúng huyền dịch 0,5 Mc farland. Cấy dàn đều khuẩn lạc trên môi trường. Đặt khoanh OP đúng giữa môi trường MH máu. Ủ 37°C x 18-24 giờ Đo đường kính vòng vô khuẩn > 14 mm: nhạy cảm Đường kính vòng vô khuẩn ≤ 14 mm: đề kháng		
11	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán - <i>S. pneumoniae</i> nhạy với OP - <i>S. viridans</i> kháng OP		
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng		
13	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 19. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN CẦU KHUẨN GRAM ÂM: LẬU CẦU

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập lậu cầu.
- Tiến hành phân lập lậu cầu theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán lậu cầu bằng hình thể.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm

NỘI DUNG

1. Chẩn đoán lậu cầu: bằng kỹ thuật nhuộm gram

Nguyên tắc

Vi khuẩn bắt màu Gram âm hay Gram dương do sự khác nhau về thành phần, cấu trúc vách tế bào của vi khuẩn. Vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày, nhiều acid teichoic, chúng không bị ảnh hưởng bởi sự tẩy màu bằng cồn, vẫn giữ nguyên được màu tím ban đầu nếu vách tế bào không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như tuổi, tác dụng của kháng sinh...

Vi khuẩn Gram âm có một lớp peptidoglycan gắn với lớp phospholipid kép, xen kẽ các protein ở màng ngoài, lớp màng này dễ bị phá hủy bởi cồn khi tẩy màu, do đó phức hợp tinh thể tím gentian - iod không bền, bị tẩy màu và màu được thay bởi các thuốc nhuộm khác.

1.1. Chuẩn bị

- **Trang thiết bị**

- + Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- + Kính hiển vi quang học.
- + Máy ly tâm
- + Máy trộn, lắc
- + Ống vô trùng có nắp đậy.
- + Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.

+ Pipet Pasteur vô trùng.

- Sinh phẩm hóa chất

+ Bộ thuốc nhuộm Gram:

+ Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.

+ Cồn tuyệt đối

- Bệnh phẩm:

+ Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.

+ Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.

1.2. Tiến hành

- Dàn bệnh phẩm và nhuộm gram: Sinh viên thực hiện quy trình nhuộm gram và nhận định hình thể vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN LẠU CẦU BẰNG NHUỘM SOI

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ Chuẩn bị hóa chất	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô

	- Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm		khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở lam kính	ránh nhằm lẫn Dàn đều vi khuẩn và dễ quan sát	Đánh dấu vị trí dàn bệnh phẩm có kích thước 1x2 cm lên mặt sau của lam kính.
5	Dàn bệnh phẩm: Thực hiện trong tủ an toàn sinh học	Đảm bảo vô khuẩn, không bị nhiễm lọ đựng bệnh phẩm.	- Nếu bệnh phẩm là chất lỏng: Khử khuẩn que cấy và lấy 1 ăng bệnh phẩm và dàn đều 1 ăng bệnh phẩm lên mặt trước của lam kính. - Bệnh phẩm là khuẩn lạc: nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô khuẩn lên lam kính, lấy 1 khuẩn lạc nghiền. Trộn đều với nước muối sinh lý.
6	Cố định tiêu bản	Hình thể vi khuẩn không thay đổi	Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gân tay thấy nóng vừa).
7	- Xếp tiêu bản lên giá nhuộm - Nhỏ dung dịch tím gentian	Số lượng thuốc nhuộm sẽ đủ cho mỗi tiêu bản, tất cả vi khuẩn đều bắt màu tím gentian	- Xếp tiêu bản lên giá nhuộm: xếp tách rời các tiêu bản. - Nhỏ dung dịch tím gentian phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 45 giây. Rửa nước
8	Nhỏ dung dịch lugol	Tất cả vi khuẩn đều bắt màu lugol	Nhỏ dung dịch lugol phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 60 giây. Rửa nước
9	Tẩy còn tuyệt đối	Tất cả vi khuẩn gram (-) bị tẩy màu bằng còn tuyệt đối.	Tẩy còn tuyệt đối, đến khi hết màu tím và rửa nước
10	Nhỏ dung dịch đỏ fuccin	Tất cả vi khuẩn gram (-) đều bắt màu đỏ fuccin.	Nhỏ dung dịch tím fuccin phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 30 giây. Rửa nước và để khô tự nhiên

11	Nhận định kết quả	Kết quả chẩn đoán	Quan sát dưới kính hiển vi Lậu cầu: song cầu hình hạt cà phê bắt màu gram (-), nằm trong và ngoài bạch cầu đoạn trung tính thoái hóa
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
13	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

*** Chuyển sang vật kính dầu quan sát hình ảnh vi khuẩn và tế bào**

- Quan sát trong bệnh phẩm có nhiều bạch cầu trung tính thoái hóa, có tế bào biểu mô

- Tiêu chuẩn chẩn đoán: Quan sát thấy song cầu hình hạt cà phê bắt màu gram âm, đứng thành đôi có thể nằm trong hoặc ngoài bạch cầu hạt trung tính thoái hóa.

1.3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

* Nhận định kết quả kỹ thuật: theo tiêu chuẩn chẩn đoán

* Các sai số và cách khắc phục.

- Dụng cụ phải vô khuẩn.

- Nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.

1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh

- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm

- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

1.5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN LẬU CẦU BẰNG NHUỘM SOI

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá
-----	----------	------------	----------

			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm.		
	Chuẩn bị hóa chất	+ Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở lam kính	Đánh dấu vị trí dán bệnh phẩm có kích thước 1x2 cm lên mặt sau của lam kính.		
5	Dán bệnh phẩm: Thực hiện trong tủ an toàn sinh học	- Nếu bệnh phẩm là chất lỏng: Khử khuẩn que cấy và lấy 1 ăng bệnh phẩm và dán đều 1 ăng bệnh phẩm lên mặt trước của lam kính. - Bệnh phẩm là khuẩn lạc: nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô khuẩn lên lam kính, lấy 1 khuẩn lạc nghiền. Trộn đều với nước muối sinh lý.		

6	Cố định tiêu bản	Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa).		
7	- Xếp tiêu bản lên giá nhuộm - Nhỏ dung dịch tím gentian	- Xếp tiêu bản lên giá nhuộm: xếp tách rời các tiêu bản. - Nhỏ dung dịch tím gentian phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 45 giây. Rửa nước		
8	Nhỏ dung dịch lugol	Nhỏ dung dịch lugol phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 60 giây. Rửa nước		
9	Tẩy còn tuyệt đối	Tẩy còn tuyệt đối, đến khi hết màu tím và rửa nước		
10	Nhỏ dung dịch đỏ fuccin	Nhỏ dung dịch tím fuccin phủ kín phần bệnh phẩm được dàn trong 30 giây. Rửa nước và để khô tự nhiên		
11	Nhận định kết quả	Quan sát dưới kính hiển vi Lậu cầu: song cầu hình hạt cà phê bắt màu gram (-), nằm trong và ngoại bạch cầu đoạn trung tính thoái hóa		
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng		
13	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 20. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TRỰC KHUẨN LAO

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập trực khuẩn lao.
- Tiến hành phân lập trực khuẩn lao theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán trực khuẩn lao.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

Nguyên tắc

Vách tế bào các *Mycobacteria* có một lượng lớn acid mycolic nên khi sử dụng phương pháp nhuộm Gram truyền thống các vi khuẩn này rất khó bắt màu. Do đó, phải sử dụng phương pháp nhuộm kháng cồn kháng acid để quan sát các vi khuẩn này. Phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen sử dụng 2 hoá chất nhuộm màu là carbol fuchsin và xanh methylen kết hợp với chất tẩy màu (hỗn hợp acid-alcohol) để phát hiện các trực khuẩn kháng cồn kháng acid.

1. Chuẩn bị

* *Trang thiết bị*

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

* *Sinh phẩm hóa chất*

- Hóa chất nhuộm:
 - + Dung dịch Carbol fuchsin
 - + Dung dịch Acid-alcohol 3%

+ Dung dịch xanh methylen

* Bệnh phẩm:

- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.

- Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.

2. Tiến hành

* **Làm tiêu bản**

- Chuẩn bị lam kính sạch, không xước vỡ, nhúng vào dung dịch ethanol 95%.

- Sử dụng kẹp gấp lam kính, để ráo còn, hơi lam kính trên ngọn lửa đèn cồn.

- Dán nhãn thông tin mẫu bệnh phẩm.

- Dùng bút viết kính khoanh tròn, đánh dấu vị trí phết bệnh phẩm, ở mặt dưới lam kính.

- Bệnh phẩm lâm sàng nghi ngờ có chứa *Mycobacteria* như: Đờm dịch phế quản, dịch não tủy, các loại dịch khác, mô ... Hoặc khuẩn lạc từ nuôi cấy thuần.

- Ly tâm bệnh phẩm, đổ bỏ nước nổi, lấy cặn.

- Dùng que cấy vô trùng lấy 1 vòng ống (đường kính 3mm), hoặc nhỏ một giọt bệnh phẩm lên lam kính.

- Nếu là đờm:

+ Mở nắp cốc đờm nhẹ nhàng, đặt nắp ngửa trên khay inox.

+ Dùng đầu vát của que phết bằng chọn lấy chỗ đờm nhầy mũ nhẹ nhàng cắt mẫu đờm bằng cách di cạnh vát que gỗ vào thành cốc đờm (lưu ý: mỗi bệnh phẩm dùng que phết riêng).

+ Đậy nắp cốc đờm

+ Đặt que phết có mẫu bệnh phẩm vào giữa lam kính và dàn theo vòng xoắn ốc từ trong ra ngoài, dàn đều đặn liên tục tạo độ mịn, dày vừa phải hình ô van kích thước dài

2 cm rộng 1 cm.

+ Ngâm que phết sau khi dàn vào dung dịch sát khuẩn phenol 5% hoặc Javel 0,5%.

* **Cố định tiêu bản**

- Để tiêu bản khô tự nhiên trong tủ ATSH hoặc làm khô ở 60°C.

- Cố định tiêu bản.

- Đặt tiêu bản lên mâm kính và để tiêu bản khô tự nhiên hoàn toàn ở nhiệt độ phòng (18-25°C).

- Lưu ý: Không làm khô tiêu bản bằng đèn cồn hoặc ánh nắng mặt trời.

*** Phủ thuốc nhuộm**

- Đặt tiêu bản lên giá nhuộm.
- Nhuộm màu:
 - + Phủ đầy dung dịch carbol fuchsin lên mặt tiêu bản đã được cố định.
 - + Hơ nóng trên ngọn lửa đèn cồn đến khi bốc hơi (không được để sôi) 1 lần.
 - + Để nguội tự nhiên trong 5 phút.
 - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Tẩy màu:
 - + Phủ đầy dung dịch Acid-alcohol 3%
 - + Duy tiêu bản trong 2 phút.
 - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Nhuộm nền:
 - + Phủ dung dịch xanh Metylen trong 1-2 phút.
 - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ
- Làm khô tiêu bản trước khi soi kính.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TK LAO BẰNG NHUỘM ZIEHL-NEESEN

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ Chuẩn bị hóa chất	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm. + Bộ nhuộm Ziehl- neelsen, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới,

	<p>phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.</p> <p>- Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm</p>		<p>mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.</p> <p>- Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.</p>
4	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở lam kính</p>	<p>Tránh nhầm lẫn Dàn đều vi khuẩn và dễ quan sát</p>	<p>Đánh dấu vị trí dàn bệnh phẩm có kích thước 1x2 cm lên mặt sau của lam kính.</p>
5	<p>Dàn bệnh phẩm: Thực hiện trong tủ an toàn sinh học</p>	<p>Đảm bảo vô khuẩn, không bị nhiễm.</p>	<p>Khử khuẩn que cấy và dùng ống lấy bệnh phẩm. Dàn đều bệnh phẩm lên vùng đã đánh dấu của lam kính.</p>
6	<p>Để khô trong tủ an toàn sinh học</p>	<p>Hình thể vi khuẩn không thay đổi</p>	<p>Khô tự nhiên</p>
7	<p>Cố định tiêu bản</p>	<p>Hình thể vi khuẩn không thay đổi, vi khuẩn chết.</p>	<p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gân tay thấy nóng vừa).</p>
8	<p>Nhỏ dung dịch Fuchsin 0,3% Rửa tiêu bản</p>	<p>Số lượng thuốc nhuộm sẽ đủ cho mỗi tiêu bản Tất cả vi khuẩn đều bắt màu đỏ Fuchsin</p>	<p>Nhỏ dung dịch Fuchsin 0,3% phủ kín bệnh phẩm. Hơ phía dưới tiêu bản cho đến bốc khói trắng thì dừng lại. Nếu thuốc nhuộm cạn thì bổ sung thêm. Thời gian 5 phút. Điều chỉnh vòi nước chảy vừa phải không quá mạnh. cho đến khi tiêu bản sạch.</p>
9	<p>Tẩy màu bằng cồn acid và rửa tiêu bản.</p>	<p>Tất cả vi khuẩn không phải là AFB sẽ bị tẩy màu</p>	<p>Nhỏ cồn acid lên phần bệnh phẩm để trong 3 phút. Tẩy cho đến khi không còn màu đỏ trên tiêu bản. Rửa nước và nghiêng</p>

10	Nhuộm nền bằng xanhmetylen và rửa nước Để khô tự nhiên	Tất cả vi khuẩn không phải là AFB đều bắt màu xanhmetylen Tiêu bản không bị bong	Nhỏ Xanhmetylen phủ kín lên phần bệnh phẩm, để 1 phút. Rửa nước và nghiêng cho tiêu bản ráo nước. Để khô ở nhiệt độ phòng
11	Nhận định kết quả	Kết quả chính xác	Soi VK x100: vi khuẩn và các tế bào không phải là AFB sẽ bắt màu xanh, còn nếu là AFB thì có hình que, bắt màu đỏ Đánh giá mật độ: 1+; 2++, 3++
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
13	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

*** Đánh giá mật độ AFB**

- Quan sát AFB bằng vật kính dầu (x100) trên kính hiển vi quang học.
- Âm tính: không quan sát thấy hình ảnh của AFB.
- Dương tính: AFB bị các trục khuẩn mảnh, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng AFB	Kết quả	Phân loại
Không AFB/100 vi trường	Âm tính	
Có > 10 AFB/ 1vi trường (Soi ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	AFB 3 (+)
Có từ 1-10 AFB/ 1 vi trường (Soi ít nhất 50 vi trường)	Dương tính	AFB 2 (+)

Có từ 10-99 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	AFB 1 (+)
Có từ 1-9 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng AFB cụ thể/100 vi trường

3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- * Nhận định kết quả kỹ thuật: theo tiêu chuẩn chẩn đoán
- * Các sai số và cách khắc phục.
- + Chất lượng môi trường thu thử, hóa chất phải được đảm bảo.
- + Dụng cụ phải vô khuẩn.
- + Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- + Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.
- + Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.
- + Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.
- + Các kỹ năng thực hiện đúng.

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

5. Lượng giá: bảng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TK LAO BẰNG NHUỘM ZIEHL-NEELSEN

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam		

	Chuẩn bị hóa chất	kính, thùng rác lây nhiễm. + Bộ nhuộm Ziehl- neelsen, còn sát khuẩn, còn 90 ⁰		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở lam kính	Đánh dấu vị trí dàn bệnh phẩm có kích thước 1x2 cm lên mặt sau của lam kính.		
5	Dàn bệnh phẩm: Thực hiện trong tủ an toàn sinh học	Khử khuẩn que cấy và dùng ống lấy bệnh phẩm. Dàn đều bệnh phẩm lên vùng đã đánh dấu của lam kính.		
6	Để khô trong tủ an toàn sinh học	Khô tự nhiên		
7	Cố định tiêu bản	Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa).		
8	Nhỏ dung dịch Fuchsin 0,3% Rửa tiêu bản	Nhỏ dung dịch Fuchsin 0,3% phủ kín bệnh phẩm. Hơ phía dưới tiêu bản cho đến bốc khói trắng thì dừng lại. Nếu thuốc nhuộm cạn thì bổ sung thêm. Thời gian 5 phút. Điều chỉnh vòi nước chảy vừa phải không quá mạnh. cho đến khi tiêu bản sạch.		
9	Tẩy màu bằng cồn acid và rửa tiêu bản.	Nhỏ cồn acid lên phần bệnh phẩm để trong 3 phút. Tẩy cho đến khi không còn màu đỏ trên tiêu bản.		

		Rửa nước và nghiêng		
10	Nhuộm nền bằng xanhmetylen và rửa nước Để khô tự nhiên	Nhỏ Xanhmetylen phủ kín lên phần bệnh phẩm, để 1 phút. Rửa nước và nghiêng cho tiêu bản ráo nước. Để khô ở nhiệt độ phòng		
11	Nhận định kết quả	Soi VK x100: vi khuẩn và các tế bào không phải là AFB sẽ bắt màu xanh, còn nếu là AFB thì có hình que, bắt màu đỏ Đánh giá mật độ: 1+; 2++, 3++		
12	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
13	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 21. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN TRỰC KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập 1 số loại vi khuẩn thuộc họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*).
- Tiến hành phân lập 1 số loại vi khuẩn thuộc họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*) gây bệnh thường gặp theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán 1 số loại vi khuẩn thuộc họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*).

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

Nguyên tắc

Vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* rất đa dạng. Việc định danh và xếp vào nhóm này dựa vào các tính chất sinh hóa và đặc điểm kháng nguyên (antigen). Đặc điểm chung của nhóm vi khuẩn này là vi khuẩn hình que, bắt màu Gram âm, một số vi khuẩn có tính di động, hầu hết mọc tốt ở 37°C. Đây là họ vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, oxidase âm tính, catalase dương tính. Một số các vi khuẩn thuộc họ này có thể định danh dựa trên các tính chất sinh hóa. Một số vi khuẩn (*Salmonella*) lại cần phải định danh dựa vào tính chất sinh hóa và phản ứng ngưng kết antisera đa giá. Vì tính đa dạng của họ vi khuẩn này nên tài liệu chỉ hướng dẫn định danh một số vi khuẩn thường gặp và có tầm quan trọng gây bệnh trên lâm sàng

Chẩn đoán họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*)

1. Chuẩn bị

* Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂

* Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 μL
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

*** Vật liệu**

Môi trường nuôi cấy:

- Blood agar
- MacConkey agar
- Một số các môi trường chọn lọc khác dành cho vi khuẩn Gram âm đường ruột
(nếu có): CLED agar, DCA, XLD, SS,

Hóa chất:

- Catalase (3% H_2O_2), Oxidase test, Urea test, Methyl red, Citrat, Môi trường di động, Indole, VP, Ornithine decarboxylase, Lysine decarboxylase.
- Các bộ ngưng kết serogroup, antigen của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột (*Salmonella, Shigella*).
- Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API Strep...), kit định danh tự động (ví dụ card định danh vi khuẩn Gram dương của VITEK, Pheonix; hóa chất định danh của kỹ thuật MALDI-TOF...)

- Bệnh phẩm

- + Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.
- + Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
- + Bệnh phẩm: đờm, máu, nước tiểu, các dịch khác...

2. Tiến hành

- Quy trình nuôi cấy: Sinh viên thực hiện quy trình nuôi cấy

Các nội dung:

- + Nhận xét mẫu xét nghiệm
- + Kỹ thuật nhuộm gram
- + Nhận định hình thể vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm
- + Lựa chọn môi trường nuôi cấy
- + Kỹ thuật cấy: phân vùng.
- Quy trình chẩn đoán vi khuẩn: sinh viên thực hiện các bước chẩn đoán giống kỹ

thuật chẩn đoán *Streptococcus*, các bước khác giảng viên hướng dẫn.

Các nội dung:

- + Đọc tính chất khuẩn lạc và nhuộm gram khuẩn lạc
- + Thử nghiệm oxydase
- + Thử nghiệm lên men đường
- + Thử nghiệm xác định khả năng sử dụng citrat
- + Thử nghiệm xác định tính di động của vi khuẩn
- + Thử nghiệm xác định vi khuẩn có Enzym Urease, khả năng sinh Indol, sinh hơi, sinh H₂S
- Chẩn đoán vi sinh vật và phân tích kết quả định danh dựa vào tiêu chuẩn chẩn đoán.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH ENTEROBACTERIACEA

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm.
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất + Môi trường: thạch thường, thạch Mc conkey. + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰

3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi hình thể vi khuẩn.	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	Vi khuẩn bắt màu đúng	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.</p>
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch Mac conkey.</p> <p>Kỹ thuật cấy phân</p>	Tách được khuẩn mọc lạc riêng rẽ	<ul style="list-style-type: none"> - Thạch thường và thạch Mac conkey là môi trường thích hợp cho <i>enterobacteriaceae</i> mọc. - KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến

	vùng.		vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề tủ âm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ
8	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dang, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc	Nhận định đúng vi khuẩn	- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 5 μm. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: trực khuẩn gram (+).
9	Xác định 1 số tính chất sinh vật hóa học Thử nghiệm Oxydase	Nhận định đúng TCSVHH	Thử nghiệm Oxydase (-)
10	Cấy vào môi trường: KIA, Manit, Citrat, Ure- Indol	Nhận định đúng TCSVHH	KIA: Cây thạch ống 2 phần thẳng và mặt nghiêng Citrat: cây thạch ống mặt nghiêng. Mannit: Cây thạch mềm Ure- Indol: cấy môi trường lỏng 37 ⁰ C x 18 -24 giờ
11	Độc tính chất sinh vật hóa học	Nhận định đúng TCSVHH	KIA: Lên men đường glucose, lactose, sinh hơi, sinh H ₂ S Manit: di động hoặc không di động Citrat simons: Có hoặc không sử dụng citrat Ure- indol: có hoặc không có Urease và có hoặc không sinh Indol
12	Nhận định kết quả	Kết quả định danh	theo tiêu chuẩn chẩn đoán của từng vi khuẩn thuộc nhóm <i>Enterobacteriaceae</i>
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay

14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác
----	---------------------------	---	-------------------------------

*** Tiêu chuẩn chẩn đoán**

Tính chất sinh vật hóa học	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>
Oxydase	-	-	-	-	-
Lên men đường glucose	+	+	+	+	+
Lên men đường lactose	+	-	-	+	-
Sử dụng Natri citrat	-	-/+	-	+	-/+
Di động	+	+	-	-	+
Sinh hơi	+	-	-	-	+/-
Sinh H ₂ S	-	+	-	-	+
Có Urease	-	-	-	-	+
Sinh Indol	+	-	-	-	-
Tính chất khuẩn lạc	S	S	S	Nhảy	Mọc lan

3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- * Nhận định kết quả kỹ thuật.
- * Các sai số và cách khắc phục.
- + Chất lượng môi trường thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.
- + Dụng cụ phải vô khuẩn.
- + Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- + Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.
- + Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.
- + Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.
- + Các kỹ năng thực hiện đúng.

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

**BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CÂY VÀ ĐỊNH DANH
ENTEROBACTERIACEA**

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm. - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất	+ Môi trường: thạch thường, thạch Mc conkey. + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.		
4	Nhuộm gram bệnh phẩm Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính. Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.		

	dạ.			
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoan 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoan.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>		
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.</p>		
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch Mac conkey.</p> <p>Kỹ thuật cấy phân vùng.</p>	<p>- Thạch thường và thạch Mac conkey là môi trường thích hợp cho <i>enterobacteriaceae</i> mọc.</p> <p>- KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm.</p> <p>Để tủ ấm 37°C x 18 -24 giờ</p>		
8	<p>Độc tính chất khuẩn lạc:</p> <p>Hình dạng, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc</p>	<p>- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 5 µm.</p> <p>- Nhuộm Gram khuẩn lạc: trực khuẩn gram (+).</p>		
9	<p>Xác định 1 số tính chất sinh vật hóa học</p> <p>Thử nghiệm Oxydase</p>	<p>Thử nghiệm Oxydase (-)</p>		

10	Cấy vào môi trường: KIA, Manitt, Citrat, Ure- Indol	KIA: Cây thạch ống 2 phần thẳng và mặt nghiêng Citrat: cây thạch ống mặt nghiêng. Mannit: Cây thạch mềm Ure- Indol: cây môi trường lỏng 37 ⁰ C x 18 -24 giờ		
11	Độc tính chất sinh vật hóa học	KIA: Lên men đường glucose, lactose, sinh hơi, sinh H ₂ S Manit: di động hoặc không di động Citrat simons: Có hoặc không sử dụng citrat Ure- indol: có hoặc không có Urease và có hoặc không sinh Indol		
12	Nhận định kết quả	theo tiêu chuẩn chẩn đoán của từng vi khuẩn thuộc nhóm <i>Enterobacteriaceae</i>		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

BÀI 22. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

MỤC TIÊU

* Kỹ năng

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập được *Pseudomonas aeruginosa*.
- Tiến hành phân lập *Pseudomonas aeruginosa* theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán *Pseudomonas aeruginosa*.

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm

NỘI DUNG

Nguyên tắc

Đặc điểm chung của nhóm vi khuẩn này vi khuẩn hình que, bắt màu Gram âm, hiếu khí và không có bào tử. Một số vi khuẩn trong nhóm này có thể oxy hóa glucose và cho phản ứng catalase dương tính.

1. Chuẩn bị

* *Trang thiết bị*

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂

* *Dụng cụ*

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 μ L
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

* *Vật liệu*

Môi trường nuôi cấy:

- Blood agar
- MacConkey agar

Hóa chất:

- Oxidase test, Urea test, Methyl red, Citrat, Môi trường di động, Indole, VP.
- Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API NE...), kit định danh tự động (ví dụ card định danh vi khuẩn Gram âm của VITEK, Pheonix; hóa chất định danh của kĩ thuật MALDI-TOF...)

* Bệnh phẩm:

- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.
- Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.

2. Tiến hành

- Quy trình nuôi cấy: Sinh viên thực hiện quy trình nuôi cấy

Các nội dung:

- + Nhận xét mẫu xét nghiệm
- + Kỹ thuật nhuộm gram
- + Nhận định hình thể vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm
- + Lựa chọn môi trường nuôi cấy
- + Kỹ thuật cấy: phân vùng.
- Quy trình chẩn đoán vi khuẩn: sinh viên thực hiện các bước chẩn đoán giống kỹ thuật chẩn đoán *Enterobacteriaceae*, các bước khác giảng viên hướng dẫn.

Các nội dung:

- + Đọc tính chất khuẩn lạc và nhuộm gram khuẩn lạc
- + Thử nghiệm oxydase
- + Thử nghiệm lên men đường
- + Thử nghiệm xác định khả năng sử dụng citrat
- + Thử nghiệm xác định tính di động của vi khuẩn
- + Thử nghiệm xác định vi khuẩn có Enzym Urease, khả năng sinh Indol, sinh hơi, sinh H₂S
- Chẩn đoán vi sinh vật và phân tích kết quả định danh dựa vào tiêu chuẩn chẩn đoán.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH

P. AERUGINOSA

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt

		Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm.
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		- Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất + Môi trường: thạch thường, thạch Mc conkey. + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	Nhuộm gram bệnh phẩm Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dán bệnh phẩm bằng bút dạ.	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính. Vùng dán bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.
5	Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản Dùng pipet hút bệnh phẩm	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay	Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.

	<p>và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoan 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>đôi hình thể vi khuẩn.</p>	<p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Vi khuẩn bắt màu đúng</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.</p>
7	<p>Nuôi cấy</p> <p>Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch Mac conkey.</p> <p>Kỹ thuật cấy phân vùng.</p>	<p>Tách được khuẩn lạc mọc riêng rẽ</p>	<p>- Thạch thường và thạch Mac conkey là môi trường thích hợp cho <i>P. aeruginosa</i> mọc.</p> <p>- KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm.</p> <p>Để tủ ấm 37°C x 18 -24 giờ</p>
8	<p>Đọc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc</p>	<p>Nhận định đúng vi khuẩn</p>	<p>- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 2 µm.</p> <p>- Nhuộm Gram khuẩn lạc: trực khuẩn gram (+).</p>
9	<p>Xác định 1 số tính chất sinh vật hóa học</p> <p>Thử nghiệm Oxydase</p>	<p>Nhận định đúng TCSVHH</p>	<p>Thử nghiệm Oxydase (+)</p>

10	Cấy vào môi trường: KIA, Manit, Citrat, Ure- Indol	Nhận định đúng TCSVHH	KIA: Cây thạch ống 2 phần thẳng và mặt nghiêng Citrat: cây thạch ống mặt nghiêng. Mannit: Cây thạch mềm Ure- Indol: cấy môi trường lỏng 37 ⁰ C x 18 -24 giờ
11	Độc tính chất sinh vật hóa học	Nhận định đúng TCSVHH	KIA: Không lên men đường glucose, lactose, không sinh hơi, không sinh H ₂ S Manit: Có di động Citrat: Có khả năng sử dụng citrat Ure- indol: không có Urease và không sinh Indol
12	Nhận định kết quả	Kết quả định danh chính xác	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán <i>P. aeruginosa</i>
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

* Nhận định kết quả kỹ thuật.

Tính chất sinh vật hóa học	<i>P. aeruginosa</i>
Oxydase	+
Lên men đường glucose	-
Lên men đường lactose	-
Sử dụng Natri citrat	+

Di động	+
Sinh hơi	-
Sinh H ₂ S	-
Có Urease	-
Sinh Indol	-
Tính chất khuẩn lạc	Tòe, màu ánh kim

* Các sai số và cách khắc phục.

+ Chất lượng môi trường thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.

+ Dụng cụ phải vô khuẩn.

+ Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.

+ Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.

+ Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.

+ Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.

+ Các kỹ năng thực hiện đúng.

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh

- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm

- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *P. AERUGINOSA*

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm.		

	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất	<ul style="list-style-type: none"> - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất + Môi trường: thạch thường, thạch Mc conkey. + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90⁰ 		
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h. 		
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dần bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dần bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>		
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng nhiệt độ</p>	<p>Tiêu bản dần không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)</p>		
6	<p>Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100</p>	<p>Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính</p>		

		hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.		
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch thường và thạch Mac conkey. Kỹ thuật cấy phân vùng.	- Thạch thường và thạch Mac conkey là môi trường thích hợp cho <i>P. aeruginosa</i> mọc. - KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ		
8	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc	- Dạng: S, kích thước 0,5 đến 2 µm. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: trực khuẩn gram (+).		
9	Xác định 1 số tính chất sinh vật hóa học Thử nghiệm Oxydase	Thử nghiệm Oxydase (+)		
10	Cấy vào môi trường: KIA, Manit, Citrat, Ure-Indol	KIA: Cấy thạch ống 2 phần thẳng và mặt nghiêng Citrat: cấy thạch ống mặt nghiêng. Mannit: Cấy thạch mềm Ure- Indol: cấy môi trường lỏng 37°C x 18 -24 giờ		
11	Độc tính chất sinh vật hóa học	KIA: Không lên men đường glucose, lactose, không sinh hơi, không sinh H ₂ S Manit: Có di động Citrat: Có khả năng sử dụng citrat Ure- indol: không có Urease và không sinh Indol		
12	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán <i>P. aeruginosa</i>		

13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 23. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng**

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để phân lập *Haemophilus Influenzae*
- Tiến hành phân lập *Haemophilus Influenzae* theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán *Haemophilus Influenzae*.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

Nguyên tắc

Sử dụng các thử nghiệm yếu tố X, V, XV, các phản ứng sinh hóa (ODC, URE và IND) và các phương tiện khác để định danh, định typ vi khuẩn *Haemophilus* phân lập được.

1. Chuẩn bị

*** Dụng cụ, hóa chất, trang thiết bị**

- *Môi trường và sinh phẩm cho nuôi cấy phân lập:*

- + Thạch chocolat, thạch máu,
- + Khoanh giấy X, V, XV, Khoanh giấy Cefinase.
- + Nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Dung dịch Acetein (N-acetylL-cystine).
- + Bộ nhuộm Gram, Cồn 70°.

- *Dụng cụ và trang thiết bị cho nuôi cấy phân lập:*

- + Que cấy dung tích 1µl và 10µl.
- + Các loại ống nghiệm thủy tinh 15 - 20 ml.
- + Ống nghiệm nhựa (cryotube và eppendorf bảo quản mẫu và ly tâm).
- + Giá để ống nghiệm.
- + Ống hút nhựa 1 ml (có quả bóp) dùng một lần.
- + Lam kính và lamên.
- + Đèn cồn.
- + Kính hiển vi.
- + Máy Vortex.

+ Máy ly tâm thường (4000 - 10.000 vòng).

+ Tủ ấm CO₂ hoặc tủ ấm thường + bình kín (để đốt được nên).

** Các loại bệnh phẩm*

- Bệnh phẩm đường hô hấp: Đờm, dịch hút ty hầu, dịch hút nội khí quản, tăm bông ngoáy ty hầu, tăm bông ngoáy họng.

- Bệnh phẩm từ tổ chức bị bệnh: Dịch não tủy, máu.

Cách lấy bệnh phẩm

- Chất dịch đường hô hấp: Lấy chất dịch đường hô hấp trong những trường hợp viêm phổi, viêm phế quản, viêm phế quản phổi... đờm, dịch ty hầu.

- Dịch não tủy: Lấy dịch não tủy trong trường hợp nghi viêm màng não.

- Máu: Lấy máu trong trường hợp bệnh nhân sốt cao, nghi nhiễm khuẩn huyết hoặc nghi viêm màng não, viêm phổi cấp.

- Các bệnh phẩm khác: Mủ amidan, mủ tai giữa, dịch chọc phổi.

** Kiểm tra bệnh phẩm*

- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.

- Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.

2. Tiến hành

Các nội dung:

+ Đọc tính chất khuẩn lạc và nhuộm gram khuẩn lạc

+ Thử nghiệm vệ tinh

- Chẩn đoán vi sinh vật và phân tích kết quả định danh dựa vào tiêu chuẩn chẩn đoán.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *H. INFLUENZAE*

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn

2	Chuẩn bị dụng cụ	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm. - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất + Môi trường: thạch Chocolate. + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90⁰
	Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất		
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h.
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	Tránh nhầm lẫn và định hướng chẩn đoán	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt</p>	Vi khuẩn được dàn đều, không làm lây lan và không thay đổi	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an</p>

	ngược với mặt khoan 2-3 giọt bệnh phẩm. Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính. Để khô và cố định bằng nhiệt độ	hình thể vi khuẩn.	toàn sinh học. Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có găng tay thấy nóng vừa)
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Vi khuẩn bắt màu đúng	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch chocolate. Kỹ thuật cấy phân vùng.	Tách được khuẩn lạc riêng rẽ	- Thạch chocolate là môi trường thích hợp cho <i>H. influenzae</i> mọc. - KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề ủ ấm 37°C x 18 -24 giờ, 5% CO ₂
	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc	Nhận định đúng vi khuẩn	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 μm. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu trực khuẩn gram (+).
8	Cấy xác định tính chất sinh vật hóa học	Nhận định đúng vi khuẩn	- Thử nghiệm X, V, XV - Thử nghiệm vệ tinh 37°C x 18 -24 giờ
9	Độc tính chất sinh vật hóa học	Giúp định danh chính xác	- Thử nghiệm X, V, XV - Thử nghiệm vệ tinh

10	Nhận định kết quả	Kết quả chính xác	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của <i>H. influenzae</i>
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
12	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- * Nhận định kết quả kỹ thuật.
- * Các sai số và cách khắc phục.
- + Chất lượng môi trường thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.
- + Dụng cụ phải vô khuẩn.
- + Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng.
- + Mẫu bệnh phẩm phải đạt yêu cầu.
- + Quy trình kỹ thuật phải thực hiện đúng theo đúng thứ tự các bước.
- + Nuôi cấy nhiệt độ, khí trường đúng với đặc điểm nuôi cấy của vi khuẩn.
- + Các kỹ năng thực hiện đúng.

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

5. Lượng giá: bảng bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH *H. INFLUENZAE*

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		

2	Chuẩn bị dụng cụ	<ul style="list-style-type: none"> - Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, kính hiển vi, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, lam kính, thùng rác lây nhiễm. - Chuẩn bị môi trường, sinh phẩm và hóa chất + Môi trường: Môi trường: thạch Chocolate + Bộ môi trường xác định tính chất SVHH: KIA, citrate simons, mannit, ure- indol, thuốc thử kovac. + Bộ nhuộm gram, cồn sát khuẩn, cồn 90⁰ 		
3	<p>Kiểm tra bệnh phẩm</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm được để trong lọ vô khuẩn, đủ số lượng để XN, thời gian lấy bệnh phẩm đến khi XN < 2h. 		
4	<p>Nhuộm gram bệnh phẩm</p> <p>Ghi thông tin lên lam kính và khoanh vùng dàn bệnh phẩm bằng bút dạ.</p>	<p>Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân lên lam kính.</p> <p>Vùng dàn bệnh phẩm ở giữa lam kính, kích thước 1 x 2 cm.</p>		
5	<p>Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản</p> <p>Dùng pipet hút bệnh phẩm và nhỏ lên mặt ngược với mặt khoanh 2-3 giọt bệnh phẩm.</p> <p>Dùng que cấy vô khuẩn dàn đều bệnh phẩm lên lam kính.</p> <p>Để khô và cố định bằng</p>	<p>Tiêu bản dàn không dày và không mỏng quá, bệnh phẩm được dàn đều hết vùng khoanh.</p> <p>Tiêu bản để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học.</p> <p>Cố định bằng nhiệt: đưa qua ngọn lửa đèn cồn 3 lần để có nhiệt độ khoảng 60-70°C (đặt trên mu tay có gang tay thấy nóng vừa)</p>		

	nhiệt độ			
6	Nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính x100	Nhuộm gram 4 thì (Nhỏ tím gentian, nhỏ dung dịch lugol, tẩy cồn tuyệt đối, đỏ fuccin), để khô Soi dưới kính hiển vi: Cầu khuẩn gram (+), xếp thành đôi hoặc chuỗi.		
7	Nuôi cấy Chọn môi trường nuôi cấy: thạch chocolate. Kỹ thuật cấy phân vùng.	- Thạch chocolate là môi trường thích hợp cho <i>H. influenzae</i> mọc. - KT cấy phân vùng: Cấy 3 vùng, đường cấy thưa dần từ vùng 1 đến vùng 2 và vùng 3. Các đường cấy không chạm thành, giữa các vùng đường cấy chỉ được chạm nhau ở những đường cấy đầu tiên. Tách được khuẩn lạc riêng rẽ, không bị nhiễm. Đề ủ ấm 37 ⁰ C x 18 -24 giờ, 5% CO ₂		
	Độc tính chất khuẩn lạc: Hình dạng, màu sắc, nhuộm khuẩn lạc	- Dạng: S, kích thước 0,2 đến 0,5 μm. - Nhuộm Gram khuẩn lạc: cầu trực khuẩn gram (+).		
8	Cấy xác định tính chất sinh vật hóa học	- Thử nghiệm X, V, XV - Thử nghiệm vệ tinh 37 ⁰ C x 18 -24 giờ		
9	Độc tính chất sinh vật hóa học	- Thử nghiệm X, V, XV - Thử nghiệm vệ tinh		
10	Nhận định kết quả	Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của <i>H. influenzae</i>		
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
12	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 24. KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH TÍNH

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng**

- Chuẩn bị phương tiện để thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ định tính (kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán) của vi khuẩn.
- Tiến hành thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ định tính (kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán) của vi khuẩn theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả kháng sinh đồ định tính (kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán) của vi khuẩn theo hướng dẫn của CLSI.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

Kỹ thuật kháng sinh đồ định tính: khoan giấy kháng sinh khuếch tán

Nguyên lý của kỹ thuật

- Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại S (sensitive – nhạy cảm), I (intermediate – trung gian), hoặc R (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn CSLI cập nhật hàng năm.

1. Chuẩn bị

- Thiết bị, dụng cụ:
 - + Tủ an toàn sinh học
 - + Tủ ấm
 - + Đèn cồn
 - + Que cấy
 - + Ống thủy tinh vô trùng 5ml
 - + Đĩa thủy tinh sạch và kim lấy máu để phân phối khoan giấy kháng sinh
 - + Máy trộn

- Hóa chất và môi trường
 - + Nước muối sinh lý 0.9%
 - + Độ đục chuẩn McFarland 0.5
 - + Khoanh kháng sinh các loại, CLSI cập nhật hàng năm.
- Bệnh phẩm:
 - Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.
 - Bệnh phẩm là chủng *S. aureus* thuần sau nuôi cấy 18- 24 giờ **2. Tiến hành**

2.1. Kỹ thuật kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán cầu khuẩn gram dương:

S. aureus

QUY TRÌNH KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ KHOANH GIẤY KHÁNG SINH KHUẾCH TÁN CỦA *S. AUREUS*

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ âm, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Môi trường Thạch MH, Khoanh KS các loại, CLSI.
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là chủng <i>S. aureus</i> thuần sau nuôi cấy 18- 24 giờ

	bệnh phẩm		
4	Chọn kháng sinh phù hợp với <i>S. aureus</i>	Hỗ trợ cho việc lựa chọn KS để điều trị	12 KS làm KSD của <i>S. aureus</i> theo hướng dẫn của CLSI FOX, CN, AK, AMC, SAM, LZD, CIP, LEV, E, C, SXT, DA
5	Chuẩn bị môi trường làm KSD - Chọn môi trường làm kháng sinh đồ: môi trường MH - Ghi thông tin người bệnh lên 2 đĩa môi trường	Đúng vị trí Tránh nhầm lẫn và giúp kết quả KSD chính xác	Môi trường MH là môi trường phù hợp để làm kháng sinh đồ cho <i>S. aureus</i> . Ghi đầy đủ thông tin: Họ tên và mã số, ngày làm KSD. Để môi trường ở nhiệt độ phòng 15-30 phút
6	Pha huyền dịch vi khuẩn	Giúp cho KQ KSD đúng	Pha huyền dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý vô khuẩn. Huyền dịch có độ đục là 0,5 Mc Farland
7	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng tấm bông vô khuẩn nhúng vào huyền dịch vi khuẩn, ép tấm bông vào thành ống nghiệm bỏ bớt dịch thừa
8	Ria cấy	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng tấm bông vô khuẩn ria cấy vi khuẩn đều khắp mặt thạch, quay đĩa 45° rồi ria lại, nên ria cấy 3 lần
9	Đặt khoanh kháng sinh	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng kẹp vô khuẩn gấp khoanh kháng sinh đặt lên mặt thạch. Đặt các khoanh kháng sinh theo nguyên tắc khoanh cách khoanh 2 cm khoanh cách thành 1 cm.
10	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Giúp cho KQ KSD đúng	Để ở nhiệt độ phòng 10 phút cho kháng sinh khuếch tán vào thạch Đề tủ ấm 37°C/18 - 24 giờ
11	Đọc kết quả	Giúp cho KQ KSD chính xác	Đo đường kính vòng vô khuẩn của các khoanh kháng sinh ra

			mm
12	Nhận định kết quả	Giúp cho KQ KSD chính xác	Nhận định kết quả kháng sinh đồ của <i>S. aureus</i> theo các mức độ nhạy cảm (S); trung gian (I); đề kháng (R) theo hướng dẫn của CLSI 2023
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

2.2. Kỹ thuật kháng sinh đồ khoan giấy khuếch tán trực khuẩn gram âm: *E. coli*

QUY TRÌNH KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ KHOANH GIẤY KHÁNG SINH KHUẾCH TÁN CỦA *E. COLI*

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	Giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Môi trường Thạch MH,

			Khoanh KS các loại, CLSI.
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là chủng <i>E. coli</i> thuần sau nuôi cấy 18- 24 giờ
4	Chọn kháng sinh phù hợp với <i>E. coli</i>	Hỗ trợ cho việc lựa chọn KS để điều trị	12 KS làm KSD của <i>E. coli</i> theo hướng dẫn của CLSI AMC, FEP, CAZ, CRO, AK, CN, CIP, LEV, MEM, IPM, FOT, SXT
5	Chuẩn bị môi trường làm KSD - Chọn môi trường làm kháng sinh đồ: môi trường MH - Ghi thông tin người bệnh lên 2 đĩa môi trường	Tránh nhầm lẫn và giúp kết quả KSD chính xác	Môi trường MH là môi trường phù hợp để làm kháng sinh đồ cho <i>S. aureus</i> . Ghi đầy đủ thông tin: Họ tên và mã số, ngày làm KSD. Để môi trường ở nhiệt độ phòng 15-30 phút
7	Pha huyền dịch vi khuẩn	Giúp cho KQ KSD đúng	Pha huyền dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý vô khuẩn. Huyền dịch có độ đục là 0,5 Mc Farland
8	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng tấm bông vô khuẩn nhúng vào huyền dịch vi khuẩn, ép tấm bông vào thành ống nghiệm bỏ bớt dịch thừa
9	Ria cấy	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng tấm bông vô khuẩn ria cấy vi khuẩn đều khắp mặt thạch, quay đĩa 45° rồi ria lại, nên ria cấy 3 lần

10	Đặt khoanh kháng sinh	Giúp cho KQ KSD đúng	Dùng kẹp vô khuẩn gấp khoanh kháng sinh đặt lên mặt thạch. Đặt các khoanh kháng sinh theo nguyên tắc khoanh cách khoanh 2 cm khoanh cách thành 1 cm.
11	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm	Giúp cho KQ KSD đúng	Để ở nhiệt độ phòng 10 phút cho kháng sinh khuếch tán vào thạch Để tủ ẩm 37°C/18 - 24 giờ
12	Đọc kết quả	Giúp cho KQ KSD chính xác	Đo đường kính vòng vô khuẩn của các khoanh kháng sinh ra mm
13	Nhận định kết quả	Giúp cho KQ KSD chính xác	Nhận định kết quả kháng sinh đồ của <i>E. coli</i> theo các mức độ nhạy cảm (S); trung gian (I); đề kháng (R) theo hướng dẫn của CLSI 2023
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
15	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

* Nhận định kết quả kỹ thuật cad đọc kết quả kháng sinh đồ theo hướng dẫn của CLSI

* Các sai số và cách khắc phục.

- Chất lượng môi trường, thuốc thử, hóa chất phải được đảm bảo.

- Dụng cụ phải vô khuẩn.

- Thực hiện trong tủ an toàn sinh học để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài vào làm ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả định danh.
- Thực hiện đúng các kỹ năng trong quy trình kỹ thuật.
- Nuôi cấy đúng nhiệt độ trong tủ ấm.

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

5. Lượng giá: bằng bảng kiểm

Phụ lục 1. BẢNG KIỂM KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ KHOANH GIẤY KHÁNG SINH KHUẾCH TÁN CỦA *S. AUREUS*

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Môi trường Thạch MH, Khoanh KS các loại, CLSI.		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là chủng <i>S. aureus</i> thuần sau nuôi cấy 18- 24 giờ		

4	Chọn kháng sinh phù hợp với <i>S. aureus</i>	12 KS làm KSD của <i>S. aureus</i> theo hướng dẫn của CLSI FOX, CN, AK, AMC, SAM, LZD, CIP, LEV, E, C, SXT, DA		
5	Chuẩn bị môi trường làm KSD - Chọn môi trường làm kháng sinh đồ: môi trường MH - Ghi thông tin người bệnh lên 2 đĩa môi trường	Môi trường MH là môi trường phù hợp để làm kháng sinh đồ cho <i>S. aureus</i> . Ghi đầy đủ thông tin: Họ tên và mã số, ngày làm KSD. Đề môi trường ở nhiệt độ phòng 15-30 phút		
6	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha huyền dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý vô khuẩn. Huyền dịch có độ đục là 0,5 Mc Farland		
7	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Dùng tăm bông vô khuẩn nhúng vào huyền dịch vi khuẩn, ép tăm bông vào thành ống nghiệm bỏ bớt dịch thừa		
8	Ria cây	Dùng tăm bông vô khuẩn ria cây vi khuẩn đều khắp mặt thạch, quay đĩa 45° rồi ria lại, nên ria cây 3 lần		
9	Đặt khoan kháng sinh	Dùng kẹp vô khuẩn gấp khoan kháng sinh đặt lên mặt thạch. Đặt các khoan kháng sinh theo nguyên tắc khoan cách khoan 2 cm khoan cách thành 1 cm.		
10	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Để ở nhiệt độ phòng 10 phút cho kháng sinh khuếch tán vào thạch Đề tủ ấm 37°C/18 - 24 giờ		
11	Đọc kết quả	Đo đường kính vòng vô khuẩn của các khoan kháng sinh ra mm		

12	Nhận định kết quả	Nhận định kết quả kháng sinh đồ của <i>S. aureus</i> theo các mức độ nhạy cảm (S); trung gian (I); đề kháng (R) theo hướng dẫn của CLSI 2023		
13	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
14	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

**Phụ lục 2. BẢNG KIỂM KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ KHOANH GIẤY
KHÁNG SINH KHUẾCH TÁN CỦA *E. COLI***

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, tủ ấm, que cấy, đèn cồn, ống nghiệm thủy tinh vô khuẩn, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Môi trường Thạch MH, Khoanh KS các loại, CLSI.		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định		

	<p>bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.</p> <p>- Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm</p>	<p>xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.</p> <p>- Bệnh phẩm là chủng <i>E. coli</i> thuần sau nuôi cấy 18- 24 giờ</p>		
4	<p>Chọn kháng sinh phù hợp với <i>E. coli</i></p>	<p>12 KS làm KSD của <i>E. coli</i> theo hướng dẫn của CLSI AMC, FEP, CAZ, CRO, AK, CN, CIP, LEV, MEM, IPM, FOT, SXT</p>		
5	<p>Chuẩn bị môi trường làm KSD</p> <p>- Chọn môi trường làm kháng sinh đồ: môi trường MH</p> <p>- Ghi thông tin người bệnh lên 2 đĩa môi trường</p>	<p>Môi trường MH là môi trường phù hợp để làm kháng sinh đồ cho <i>S. aureus</i>.</p> <p>Ghi đầy đủ thông tin: Họ tên và mã số, ngày làm KSD.</p> <p>Để môi trường ở nhiệt độ phòng 15-30 phút</p>		
7	<p>Pha huyền dịch vi khuẩn</p>	<p>Pha huyền dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý vô khuẩn. Huyền dịch có độ đục là 0,5 Mc Farland</p>		
8	<p>Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn</p>	<p>Dùng tấm bông vô khuẩn nhúng vào huyền dịch vi khuẩn, ép tấm bông vào thành ống nghiệm bỏ bớt dịch thừa</p>		
9	<p>Ria cây</p>	<p>Dùng tấm bông vô khuẩn ria cây vi khuẩn đều khắp mặt thạch, quay đĩa 45° rồi ria lại, nên ria cây 3 lần</p>		
10	<p>Đặt khoanh kháng sinh</p>	<p>Dùng kẹp vô khuẩn gấp khoanh kháng sinh đặt lên mặt thạch. Đặt các khoanh kháng sinh theo nguyên tắc khoanh cách khoanh 2 cm khoanh cách thành 1 cm.</p>		

11	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm	Để ở nhiệt độ phòng 10 phút cho kháng sinh khuếch tán vào thạch Để tủ ẩm 37°C/18 - 24 giờ		
12	Đọc kết quả	Đo đường kính vòng vô khuẩn của các khoanh kháng sinh ra mm		
13	Nhận định kết quả	Nhận định kết quả kháng sinh đồ của <i>E. coli</i> theo các mức độ nhạy cảm (S); trung gian (I); đề kháng (R) theo hướng dẫn của CLSI 2023		
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
15	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

Bài 25. KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN VIRUS BẰNG TEST NHANH CHẨN ĐOÁN

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng**

- Chuẩn bị phương tiện cần thiết để chẩn đoán virus bằng test nhanh
- Tiến hành phân chẩn đoán virus bằng test nhanh xác định kháng nguyên và kháng thể theo đúng quy trình.
- Nhận định và phân tích được kết quả chẩn đoán bằng test nhanh xác định kháng nguyên và kháng thể.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

- Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.
- Tuân thủ đúng các quy định về quy trình kỹ thuật của ngành kỹ thuật xét nghiệm y để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.
- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực và an toàn trong khi thực hiện xét nghiệm.

NỘI DUNG

1. Test nhanh xác định kháng nguyên

1.1. Chuẩn bị

- Thiết bị, dụng cụ:

- + Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian
- + khay đựng bệnh phẩm
- + Bộ Kit làm xét nghiệm
- + Đầu côn, pipet
- + Bút viết kính
- + Găng tay, mũ, khẩu trang
- + Sổ lưu kết quả xét nghiệm
- + Cồn sát trùng tay nhanh

- Hóa chất và môi trường

- + Cồn 90°(vệ sinh dụng cụ)
- + Cồn sát trùng tay nhanh
- + Dung dịch nước rửa tay
- + Bộ Kit làm xét nghiệm

- Bệnh phẩm:

- + Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và

Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.

+ Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.

1.2. Tiến hành

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN HBsAg CỦA VIRUS VIÊM GAN B (HBV) BẰNG TEST NHANH

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	KT tiến hành thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Bộ test HBsAg
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đôi chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.
4	Tách lấy huyết tương hoặc huyết thanh	Theo yêu cầu của kỹ thuật	Ly tâm 1000v/ phút x 5 phút

5	Kiểm tra test	Kết quả chính xác	Còn hạn sử dụng, nguyên vẹn trong bao nhôm.
6	Ghi thông tin trên test	Tránh nhầm lẫn	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở que xét nghiệm
7	Nhỏ huyết tương, huyết thanh vào buồng nhỏ bệnh phẩm	Đúng kỹ thuật	Nhỏ 100 μ l (3 giọt) huyết tương, huyết thanh hoặc máu toàn phần vào giếng mẫu với test HBsAg
8	Đọc kết quả	Phản ứng KN-KT xảy ra hoàn toàn	Đọc kết quả trong vòng 20 phút. Không đọc sau 20 phút
9	Nhận định kết quả	Kết quả chính xác	Dương tính: xuất hiện 2 vạch ở vạch T và C Âm tính: xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở vạch T. <i>Không đọc kết quả khi không xuất hiện vạch tại C</i>
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	Đảm bảo an toàn sinh học	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
11	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

1.3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- Bệnh phẩm đạt tiêu chuẩn.
- Đảm bảo còn sự nguyên vẹn của test và còn hạn sử dụng.

- Khi làm test: khi làm xét nghiệm cần vô khuẩn tránh bị nhiễm từ bên ngoài. vào, ảnh hưởng đến xét nghiệm.
- Đọc kết quả đúng thời gian quy định của nhà sản xuất.
- Nhận định kết quả kỹ thuật.
- Các sai số và cách khắc phục.

1.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

1.5. Lượng giá: bảng kiểm

BẢNG KIỂM XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN HBsAg CỦA VIRUS VIÊM GAN B (HBV) BẰNG TEST NHANH

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	ĐÁNH GIÁ	
			Đạt	Không đạt
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Bộ test HBsAg		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm		

		cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.		
4	Tách lấy huyết tương hoặc huyết thanh	Ly tâm 1000v/ phút x 5 phút		
5	Kiểm tra test	Còn hạn sử dụng, nguyên vẹn trong bao nhôm.		
6	Ghi thông tin trên test	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân vào vùng viết mã số ở que xét nghiệm		
7	Nhỏ huyết tương, huyết thanh vào buồng nhỏ bệnh phẩm	Nhỏ 100 μ l (3 giọt) huyết tương, huyết thanh hoặc máu toàn phần vào giếng mẫu với test HBsAg		
8	Đọc kết quả	Đọc kết quả trong vòng 20 phút. Không đọc sau 20 phút		
9	Nhận định kết quả	Dương tính: xuất hiện 2 vạch ở vạch T và C Âm tính: xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở vạch T. <i>Không đọc kết quả khi không xuất hiện vạch tại C</i>		
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
11	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

2. Test nhanh xác định kháng thể

2.1. Chuẩn bị

- *Thiết bị, dụng cụ:*

- + Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian
- + khay đựng bệnh phẩm

- + Bộ Kit làm xét nghiệm
 - + Đầu côn, pipet
 - + Bút viết kính
 - + Găng tay, mũ, khẩu trang
 - + Sổ lưu kết quả xét nghiệm
 - + Cồn sát trùng tay nhanh
 - *Hóa chất và môi trường*
 - + Cồn 90°(vệ sinh dụng cụ)
 - + Cồn sát trùng tay nhanh
 - + Dung dịch nước rửa tay
 - + Bộ Kit làm xét nghiệm
 - *Bệnh phẩm:*
 - + Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm.
 - + Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.
- 2.2. Tiến hành

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH IgM/IgG CỦA VIRUS DENGUE BẰNG TEST NHANH

STT	NỘI DUNG	Ý NGHĨA	TIÊU CHUẨN
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	KT tiến hành thuận lợi	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, thùng rác lây nhiễm. + Cồn sát khuẩn, cồn 90° + Bộ test xác định kháng thể của virus Dengue

3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đôi chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	Bệnh phẩm đạt yêu cầu và tránh nhầm lẫn	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.
4	Tách lấy huyết tương hoặc huyết thanh	Theo yêu cầu của kỹ thuật	Ly tâm 1000v/ phút x 5 phút
5	Kiểm tra test	Kết quả chính xác	Còn hạn sử dụng, nguyên vẹn trong bao nhôm.
6	Dengue IgM/IgG	Hút bệnh phẩm vào giếng mẫu	Dùng pipet nhựa nhỏ có sẵn trong hộp hút huyết thanh hoặc huyết tương đến vạch xanh (tương đương 10 μ l) bệnh phẩm vào giếng mẫu S
7	Nhỏ dung dịch pha loãng vào giếng tròn	Dung môi của phản ứng KN-KT	Nhỏ 4 giọt dung dịch pha loãng vào giếng tròn ở đầu test
8	Đọc kết quả	Phản ứng KN-KT xảy ra hoàn toàn	Đọc kết quả trong vòng 10- 20 phút. Không đọc sau 20 phút Dương tính: xuất hiện vạch đỏ tại vạch T và C Âm tính: Chỉ xuất hiện vạch đỏ tại vạch C Không đọc kết quả khi không xuất hiện vạch tại C
9	Nhận định kết quả	Kết quả chính xác	- IgM, IgG dương tính: xuất hiện vạch đỏ ở NS1, IgM, IgG ở vạch tương ứng - IgM, IgG âm tính: không xuất hiện vạch đỏ tại vạch NS1 ở NS1, IgM, IgG ở vạch tương ứng
10	Thu dọn dụng cụ, hóa	Đảm bảo an toàn	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí.

	chất, rác thải Rửa tay	sinh học	Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay
11	Trả kết quả và vào sổ lưu	Trả kết quả xét nghiệm, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác

2.3. Các lưu ý hoặc nguyên nhân sai lầm

- Bệnh phẩm đạt tiêu chuẩn.
- Đảm bảo còn sự nguyên vẹn của test và còn hạn sử dụng.
- Khi làm test: khi làm xét nghiệm cần vô khuẩn tránh bị nhiễm từ bên ngoài. vào, ảnh hưởng đến xét nghiệm.
- Đọc kết quả đúng thời gian quy định của nhà sản xuất.
- Nhận định kết quả kỹ thuật.
- Các sai số và cách khắc phục.

2.4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình.

2.5. Lượng giá: bảng kiểm

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH IgM/IgG CỦA VIRUS DENGUE BẰNG TEST NHANH

STT	NỘI DUNG	TIÊU CHUẨN	Đánh giá	
			Đạt	Không đạt
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị	- Dụng cụ đầy đủ và đúng yêu cầu + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ hấp, thùng rác lây nhiễm.		

	Chuẩn bị hóa chất, sinh phẩm	+ Cồn sát khuẩn, cồn 90 ⁰ + Bộ test xác định kháng thể của virus Dengue		
3	Kiểm tra bệnh phẩm - Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu yêu cầu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh. - Kiểm tra chất lượng bệnh phẩm	- Trùng khớp thông tin của ống bệnh phẩm và phiếu chỉ định xét nghiệm: Họ và Tên, tuổi, giới, mã số, khoa/phòng, chỉ định xét nghiệm. - Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch được cho vào ống có chống đông hoặc không chống đông. Thời gian lấy bệnh phẩm cho đến khi thực hiện xét nghiệm < 2 giờ.		
4	Tách lấy huyết tương hoặc huyết thanh	Ly tâm 1000v/ phút x 5 phút		
5	Kiểm tra test	Còn hạn sử dụng, nguyên vẹn trong bao nhôm.		
6	Dengue IgM/IgG	Dùng pipet nhựa nhỏ có sẵn trong hộp hút huyết thanh hoặc huyết tương đến vạch xanh (tương đương 10µl) bệnh phẩm vào giếng mẫu S		
7	Nhỏ dung dịch pha loãng vào giếng tròn	Nhỏ 4 giọt dung dịch pha loãng vào giếng tròn ở đầu test		
8	Đọc kết quả	Đọc kết quả trong vòng 10- 20 phút. Không đọc sau 20 phút Dương tính: xuất hiện vạch đỏ tại vạch T và C Âm tính: Chỉ xuất hiện vạch đỏ tại vạch C Không đọc kết quả khi không xuất hiện vạch tại C		
9	Nhận định kết quả	- IgM, IgG dương tính: xuất hiện vạch đỏ ở NS1, IgM, IgG ở vạch tương ứng - IgM, IgG âm tính: không xuất hiện vạch đỏ tại vạch NS1 ở NS1,		

		IgM, IgG ở vạch tương ứng		
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải Rửa tay	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí. Lau bề mặt tủ ATSH bằng dung dịch khử trùng. Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định. - Thực hiện đúng 6 bước rửa tay		
11	Trả kết quả và vào sổ lưu	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác		

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG GIÁO TRÌNH

Giáo trình có 284 trang, được chia làm 2 phần.

Phần I: Lý thuyết về đại cương vi sinh vật và đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh của 1 số vi khuẩn, virus gây bệnh.

Phần II: Thực hành là các xét nghiệm chẩn đoán vi sinh vật 1 số vi khuẩn và virus gây bệnh.

Giáo trình được viết dựa theo một số quyết định, thông tư của Bộ Y tế ban hành như sau:

1. Bộ Y tế (2017), *Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng*, ban hành theo Quyết định số 1539/QĐ-BYT, ngày 20/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
2. Bộ Y tế (2013), *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành vi sinh y học*, ban hành theo Quyết định số 26/QĐ-BYT, ngày 03/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
3. Bộ Y tế (2018), *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành vi sinh y học*, ban hành theo Quyết định số 6769/QĐ-BYT, ngày 08/01/2018 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
4. Bộ Y tế (2017), *Hướng dẫn kiểm soát nhiễm khuẩn trong các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh*, ban hành theo Quyết định số 3916/QĐ-BYT, ngày 28/08/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
5. Quyết định 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 *Tiêu chí đánh giá phòng xét nghiệm y học* – Cục Quản lý khám chữa bệnh.
6. Bộ Y tế (2021), *Giáo trình Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh y học*, Nhà xuất bản Y học.
6. CLSI/NCCLS (2023), "*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*".

Rất mong nhận được sự góp ý và đóng góp cho giáo trình ngày càng hoàn thiện hơn!