

TS. PHẠM HỒNG SƠN

Giáo trình

VI SINH VẬT HỌC THÚ Y

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

HUẾ - 2005

LỜI NÓI ĐẦU

NHÂN DỊP TÁI BẢN LẦN THỨ NHẤT

(Phiên bản điện tử)

Vi sinh vật học là một trong những khoa học phát triển mạnh mẽ nhất. Vì vậy, định kỳ biên soạn lại để tái bản với những kiến thức mới và cập nhật là việc rất cần thiết. Giáo trình Vi sinh vật học thú y này đã được xuất bản năm 2002 bởi Nhà xuất bản Nông nghiệp và trường Đại học Nông Lâm Huế. Nay tôi biên soạn lại trên cơ sở chỉnh lý và cập nhật kiến thức mới đáp ứng yêu cầu đăng tải dưới dạng giáo trình điện tử nhân dịp Dự án tăng cường năng lực đào tạo mức C của Đại học Huế nhằm phục vụ giảng dạy và học tập của giáo viên và sinh viên các khoa, bộ môn thú y và chăn nuôi - thú y cũng như các trường đại học liên quan sinh học.

Trong lần tái bản này nội dung nhiều chương được viết mới, nhiều chương khác có sự thay đổi. Các mục họ *Pasteurellaceae*, thuộc phần Vi khuẩn học và tất cả các chương thuộc phần Virus học đều được chỉnh lý lại. Xuất hiện một số tên họ mới như họ *Asfarviridae*, họ *Papillomaviridae*, họ *Polyomaviridae* phù hợp với kiến thức về phân loại học hiện đại, không còn chương "Đại diện các virus chưa phân loại" mà thay thế bằng chương "Prion...", một số bệnh được bổ sung. Các kỹ thuật nghiên cứu trước đây bị bỏ khỏi bản thảo do quá dày nay được phục hồi với đường kẻ ở lề trái. Các hình ảnh minh họa riêng lẻ cũng không đưa lại vào phiên bản điện tử này.

Cách ghi các thuật ngữ có nguồn gốc nước ngoài không phải gốc Hán lần này có sự thay đổi so với lần xuất bản trước. Các thuật ngữ chỉ tên hóa chất chủ yếu sử dụng chính tả (không phải ngữ pháp) tiếng Anh, đáp ứng yêu cầu của dự án mức C Đại học Huế.

Tôi cảm ơn của các đồng nghiệp vì sự hỗ trợ và ý kiến đóng góp xây dựng.

Nhân đây, tôi muốn bày tỏ cảm ơn GS Đào Trọng Đạt đã đóng góp nhiều ý kiến xây dựng nhân dịp hiệu đính bản thảo cho lần xuất bản thứ nhất.

Tác giả

LỜI NÓI ĐẦU

NHÂN DỊP XUẤT BẢN LẦN THỨ NHẤT (2002)

Trong nhiều năm qua, các trường đại học khối nông nghiệp nước ta đã có một số giáo trình vi sinh vật học thú y. Những tài liệu giảng dạy đó đã đóng góp quan trọng trong đào tạo đại học ngành thú y. Tuy nhiên, theo thời gian, cùng với sự xuất hiện những bệnh nguy hiểm mới (như Nipah, Manangle,...) và sự phát triển của khoa học kỹ thuật, đặc biệt là sinh học phân tử, nhiều kiến thức thuộc các môn sinh vật học nói chung và vi sinh vật học thú y trở nên có nhu cầu được cập nhật hóa. Ngày nay, với chính sách đổi mới của Đảng ta, giao lưu văn hóa, du lịch và thương mại,... giữa nước ta và các nước trên thế giới ngày càng mở rộng và phát triển, dẫn đến sự tăng cường xuất nhập khẩu hàng hóa trong đó có sản phẩm động vật. Thực tiễn đó đưa lại cho chúng ta nhiều mặt lợi, trong đó có việc nâng cao mức sống của nhân dân nhưng cũng đưa chúng ta gần hơn với nguy cơ nhiễm các bệnh truyền nhiễm cố hữu của các vùng địa lý khác, đòi hỏi Nhà nước ta phải có những luật lệ liên quan đến kiểm dịch thú y. Trong bối cảnh hội nhập thế giới, nội dung giáo trình môn học vi sinh vật học thú y đang sử dụng trong trường đại học nước ta hiện nay trở nên bất cập. Chẳng hạn, sau mấy năm học đại học thú y, do nội dung trong chương trình đại học chính thống thiếu hụt, sinh viên tốt nghiệp thành bác sỹ thú y vẫn còn xa lạ với tên các bệnh liệt kê trong "Danh mục bệnh phải kiểm dịch" ban hành kèm theo Quyết định số 607 NN-TY/QĐ ngày 9 tháng 6 năm 1996 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm (nay là Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn). Nếu nhận công tác kiểm dịch quốc tế, những chuyên gia thú y như thế khó có thể đảm nhiệm được chức năng nhiệm vụ của mình. Trong khi đó, kết cấu nội dung giáo trình vi sinh vật học thú y thường giống như một phiên bản cắt ngắn của giáo trình bệnh truyền nhiễm gia súc, nên giữa hai môn này có nhiều kiến thức thường trùng lặp không cần thiết. Môn Bệnh truyền nhiễm cung cấp cho sinh viên những hiểu biết về bệnh truyền nhiễm và cách khống chế (phòng, chống) bệnh truyền nhiễm, còn môn Vi sinh vật học thú y lại có mục đích là giúp người học xây dựng thế giới quan về bệnh truyền nhiễm và cách tiếp cận các nguồn gốc gây bệnh truyền nhiễm.

Nhằm khắc phục những vấn đề nêu trên, góp phần làm giảm nhẹ sự thiếu hụt trong chuyên môn của sinh viên ta so với thế giới, Bộ môn Thú y trường Đại học Nông Lâm Huế đặt ra nhiệm vụ soạn lại nội dung một số học phần đại học, trong đó có Vi sinh vật học thú y, trong khuôn khổ Chương trình khung do Bộ Giáo dục và Đào tạo và Chương trình Giáo dục của trường Đại học Nông Lâm Huế. Đó là lý do ra đời quyển giáo trình này.

Mặc dù biên soạn cho ngành thú y nhưng giáo trình này cũng dùng cho việc giảng dạy ngành chăn nuôi thú y, làm tài liệu tham khảo cho cán bộ nghiên cứu vi sinh vật, các nhà chuyên môn thú y,... Đây là học phần thứ ba trong nhóm các học phần liên tục Vi sinh vật học đại cương, Miễn dịch học, Vi sinh vật học thú y, Dịch tễ học và Bệnh truyền nhiễm gia súc, vì vậy, nhiều vấn đề không thể mô tả giáo trình này thì có thể gặp ở những giáo trình còn lại, cũng như các giáo trình thực tập liên quan.

Nội dung giáo trình gồm ba phần: Vi khuẩn học, Virus học và Nấm (chân khuẩn

học) thú y. Chương trình gồm bốn đơn vị học trình này đòi hỏi sinh viên đầu tư ít nhất hai lần thời lượng (120 giờ) tự chuẩn bị ngoài giảng đường, tương đương với chương trình đào tạo các nước phát triển.

- Phần I: **Vi khuẩn học thú y**, giới thiệu các nhóm vi khuẩn, bao gồm cả mycoplasma, rickettsia, chlamydia và bệnh truyền nhiễm tiêu biểu do vi khuẩn trong nhóm đó gây ra.

- Phần II: **Virus học thú y**, giới thiệu các nhóm virus và bệnh truyền nhiễm do cảm nhiễm virus ở động vật, theo trình tự nhóm các họ virus ADN không có áo ngoài, các họ virus DNA có áo ngoài, các họ virus ARN có áo ngoài, các họ virus ARN không có áo ngoài và các virus chưa phân loại. Do vai trò của các động vật giáp xác (tôm, cua,...) đối với nền kinh tế Việt Nam ngày càng tăng, chúng tôi bổ sung họ *Baculoviridae* là họ các virus ký sinh động vật chân đốt.

- Phần III: **Nấm (chân khuẩn học) thú y**, giới thiệu một số nấm gây bệnh nấm và bệnh trùng độc nấm ở động vật.

Hai phần trên được trình bày theo nhóm phân loại vi sinh vật hiện đại dựa trên đặc tính sinh học của chính vi sinh vật mà ít dựa theo đặc tính dịch tễ học hay đặc tính bệnh lý. Phần III, ngược lại, được trình bày theo vai trò thú y của nấm (nấm gây bệnh và nấm sinh độc tố gây ngộ độc nấm) mà không theo các nhóm phân loại, do số chủng loại nấm là rất lớn mà số nấm gây bệnh thú y thì chỉ có số lượng hạn chế.

Do đặt ra nhiệm vụ giới thiệu vi sinh vật gây bệnh thú y hiện được biết trên toàn cầu, nên giáo trình chỉ đề cập những kiến thức chung nhất, cơ bản nhất về vi sinh vật học thú y làm cơ sở cho các môn học tiếp theo trong chương trình đào tạo thú y như Bệnh truyền nhiễm gia súc, Vệ sinh gia súc, Kiểm nghiệm thú sản,... Những kỹ thuật phân loại và chẩn đoán (thực ra là *đồng định*: identification) vi sinh vật bị cắt xén so với bản thảo đầu đề giữ cho quyển sách không quá dày thì chúng tôi sẽ *chỉnh lý và giới thiệu trong cuốn "Vi sinh vật thú y thực hành"* trong thời gian tới. Còn những mục thuộc nội dung giảng dạy ở học phần Bệnh truyền nhiễm gia súc như "Phòng bệnh và chữa bệnh" *cũng không được đưa vào giáo trình này*.

Việc ghi các thuật ngữ Việt hóa không có nguồn gốc từ thuần Việt hay từ Hán - Việt, chủ yếu có nguồn gốc phương Tây và Nhật Bản (từ chữ kana), là một vấn đề lớn, phức tạp trong tiếng Việt hiện đại, làm khó khăn cho việc lập bảng tra cứu từ khóa. Hiện nay, trên thực tế tồn tại đồng thời nhiều cách ghi âm khác nhau. Ở đây chúng tôi tạm áp dụng các quy tắc sau:

- Các thuật ngữ nói trên được viết liền, không có dấu nối (trừ ít trường hợp theo nguyên gốc).

- Các thuật ngữ được ghi lại y nguyên phân thân từ (cùng với tiền tố, nếu có) vốn có của chúng trong các ngôn ngữ hệ Romantic hay Latin (ghi erythromycin, ethanol, cadaverin, hydro-, không ghi eritoromicin, êtanôn, cadaverin, hiđrô- [có ý kiến rằng nên thay chữ "d" trong chính tả tiếng Việt bằng chữ "z" [Hoàng Phê, Chính tả tiếng Việt, NXB Đà Nẵng, 1999], nhưng cần có văn bản quy phạm pháp luật chính thức hóa), trừ một số chữ hai âm tiết đã được dùng tương tự từ ghép Hán - Việt và quá thông dụng như axit (không ghi acid), bazơ (không ghi base), virus (không ghi virus), hydrô (tức hydrogen), ôxy (tức oxygen),... còn phần đuôi từ (vĩ tố), thì thường được lược bỏ ở đa số thuật ngữ trừ tên vi sinh vật và các đuôi "a" hay "ia" sau phụ âm (ghi vaccine, penicillin,... không ghi vaccine, penicillinum,... nhưng ghi salmonella, rickettsia,...), hoặc

riêng tên các enzym và đường vốn có đuôi từ "-ose" trong tiếng Anh và "-aza" và trong tiếng Nga thì ghi "-aza" (saccharose, proteinaza,...), đuôi "-ol" của một số đường thường được lược bỏ (ghi mannit, sorbit,... không ghi mannitol, sorbitol,...).

- Tên khoa học nhị danh của vi khuẩn và nấm thì viết hoa chữ cái đầu (tên chi) và in nghiêng theo quy tắc danh pháp sinh học quốc tế áp dụng từ năm 1992 theo "Bacteriological Code (1990 revision)" của International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB: Ủy ban quốc tế Vi khuẩn học phân loại hệ thống) và các hội sinh vật học phân loại khác, chữ sau viết liền, không có gạch nối, không có khoảng trắng (ghi *Salmonella choleraesuis*, không ghi *Salmonella cholerae-suis*). Tên "tam danh" chỉ dạng (á loài hay loài phụ) có chữ "subsp." (subspecies) hoặc "var." (variety) viết trước chữ thứ ba (*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *H. capsulatum* var. *duboisii*). Trường hợp tên sinh vật đó đã được Việt hóa thì viết bình thường (*salmonella*). Tên loài virus không áp dụng nguyên tắc "nhị danh" mà dùng tên tiếng Việt có tham khảo tên tiếng Anh theo đề nghị của International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV: Ủy ban quốc tế về phân loại virut), mặc dù trong một số trường hợp có bổ sung tên loài theo quy tắc nhị danh quốc tế. Tên một số hóa chất, thuốc nhuộm có thể được viết (ở lần lặp lại) bằng tiếng Anh để tiện tra cứu hóa chất thương phẩm.

Để giúp người đọc tra cứu các bệnh truyền nhiễm ghi trong "Danh mục bệnh phải kiểm dịch" của Nhà nước ta, chúng tôi chú thêm sau các tên bệnh thích hợp ký hiệu "BKD" (bệnh kiểm dịch) tiếp theo là số thứ tự của bệnh ghi trong danh mục đó sau tên tiếng Anh ở dạng ký hiệu bậc lũy thừa, trường hợp bệnh có nhiều số thứ tự thì liệt kê các số đó từ số bé đến số lớn, ví dụ: bệnh viêm gan virut vịt (duck virus hepatitis)^{BKD12,66}, bệnh dịch tả vịt (duck virus enteritis)^{BKD11,73}. Bên cạnh đó, một số thuật ngữ gốc chữ Hán phiên âm lỗi Việt chỉ tên tổ chức, bộ phận vi sinh vật hoặc tên bệnh có thể được viết kèm trong ngoặc kép, thường sau từ tiếng Anh tương ứng như là nguồn thuật ngữ tham khảo.

Việc biên soạn giáo trình này được chỉ đạo bởi đường lối của Đảng về Phát triển Văn hóa, Giáo dục - Đào tạo, Khoa học công nghệ và Môi trường "*Đổi mới căn bản và toàn diện về nội dung, phương pháp dạy và học theo hướng chuẩn hóa, hiện đại hóa và dân chủ hóa... phát huy nội lực tự học và nghiên cứu khoa học của sinh viên*" và phương châm do Luật Giáo dục nước CHXHCN Việt nam quy định "*Giáo trình đại học phải thể hiện mục tiêu, nguyên lý giáo dục, cụ thể hóa nội dung ('phải có tính hiện đại và phát triển') và phương pháp giảng dạy ('phải coi trọng việc bồi dưỡng năng lực tự học, tự nghiên cứu, tạo điều kiện cho người học phát triển tư duy sáng tạo, rèn luyện kỹ năng thực hành, tham gia nghiên cứu, thực nghiệm, ứng dụng')* quy định trong chương trình đào tạo của trường đại học". Chúng tôi đã cố gắng thể hiện tính hiện đại, tính hệ thống, tính cơ bản và tính phát triển của chương trình môn học. Tuy vậy, do khả năng có hạn, người viết khó tránh khỏi những sai sót, đặc biệt trong việc chọn lọc những kiến thức thiết yếu để giữ cho giáo trình không quá dài. Chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến quý báu của các thầy giáo, cô giáo, các quý vị đồng nghiệp, anh chị em sinh viên và bạn đọc để sách này sẽ trở nên hoàn thiện hơn trong dịp tái bản.

Nhân đây, chúng tôi muốn bày tỏ lời cảm ơn với những thành viên trong các gia đình của chúng tôi, các đồng nghiệp, bạn bè và tiền bối trong khoa KHVN đã khuyến khích, động viên chúng tôi biên soạn quyển sách này. Bên cạnh đó, sự ra đời của quyển sách này gắn với Chương trình viết giáo trình và bài giảng của trường Đại học Nông Lâm Huế, trong đó một số kinh phí, tuy khiêm nhường, đã dành cho việc biên soạn. Chúng tôi đánh giá cao sự quan tâm của nhà trường đến vấn đề nâng cao chất lượng đào tạo.

Chúng tôi chân thành cảm ơn GS. Đào Trọng Đạt, người đã khích lệ và đã bỏ rất nhiều công sức trong việc hiệu đính quyển sách này.

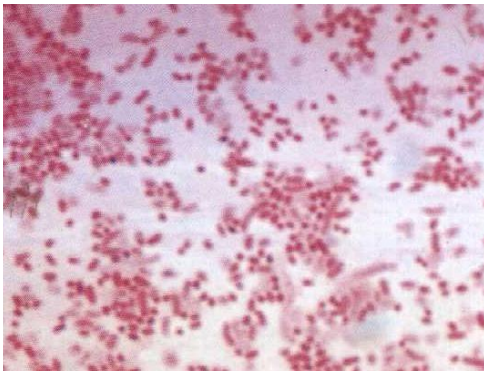
Cuối cùng, chúng tôi cáo lỗi cùng tất cả bạn đọc vì từ thời gian sách hoàn thành đến khi lên khuôn in kéo dài gần một năm nên nhiều thông tin còn chưa cập nhật kịp thời.

Tác giả

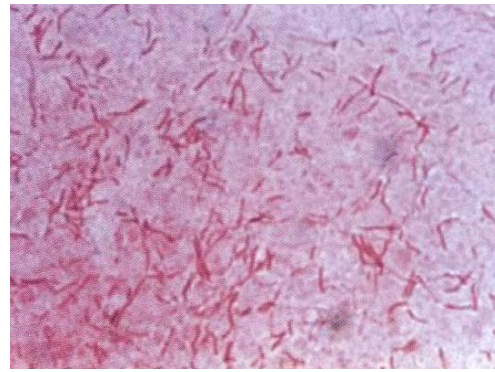
TaiLieu.vn

PHẦN I

VI KHUẨN HỌC THÚ Y



Pasteurella multocida (nhuộm Gram)



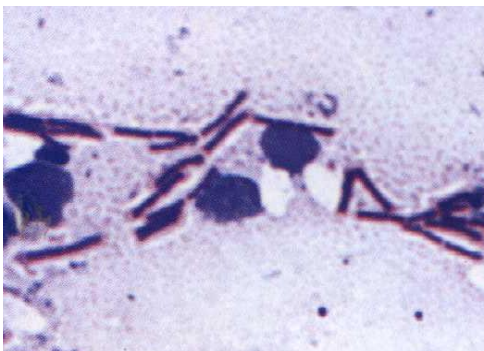
Campylobacter jejuni (nhuộm Gram)



Clostridium perfringens (nhuộm Gram)



Streptococcus suis (nhuộm Gram)



Bacillus anthracis (nhuộm Gram)



Fusobacterium necrophorum (nhuộm Gram)

Hình 1: Một số vi khuẩn tiêu biểu gây bệnh ở động vật

Chương 1

TRỰC KHUẨN GRAM ÂM YẾM KHÍ TÙY TIỆN

A. HỌ TRỰC KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT ENTEROBACTERIACEAE

I. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA HỌ ENTEROBACTERIACEAE

1. Phân loại

Họ *Enterobacteriaceae* (họ trực khuẩn đường ruột) có số lượng lớn chi khác nhau. Cho đến năm nay (2001) đã xác nhận được 105 loài thuộc 30 chi, trong đó có 6 chi vi khuẩn có ý nghĩa trong thú y và y học, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Yersinia* và *Klebsiella* (bảng I-1 đến bảng I-14). Bên cạnh đó còn có các chi *Buttiauxella* (1 loài), *Cedecea* (3 loài), *Citrobacter* (3 loài), *Enterobacter* (8 loài), *Ewingella* (1 loài), *Kluyvera* (2 loài), *Koserella* (1 loài), *Leclercia* (1 loài), *Leminorella* (1 loài), *Moellerella* (1 loài), *Morganella* (1 loài), *Proteus* (3 loài), *Providencia* (4 loài), *Raknella* (1 loài), *Serratia* (7 loài), *Tatumella* (1 loài),...

2. Hình thái

Đây là những vi khuẩn hình que nhỏ (0,4 - 0,6 2 - 4 μm), hai đầu tròn, Gram âm, tất cả, trừ *Shigella* và *Klebsiella*, do có lông roi (tiêm mao) và đều là chu mao khuẩn. Một số vi khuẩn mất khả năng hình thành tiêm mao, như *Salmonella pullorum-gallinarum* (cũng còn được coi là hai loài khác biệt *Salmonella pullorum* và *Salmonella gallinarum* hay 2 dạng huyết thanh học - serovar). Các trực khuẩn đường ruột đều không hình thành nha bào.

3. Tính trạng sinh hóa

Những tính trạng chung là yếm khí tùy tiện, lên men đường glucose, catalase dương tính, oxidase âm tính, hoàn nguyên nitrate thành nitrite, hàm lượng guanine+cytosine (G+C) (mol%) trong khoảng 39 đến 59%. Trong số các tính trạng trên thì "oxidase âm tính" là tính trạng quan trọng trong việc phân loại. Dựa vào tính trạng này, các trực khuẩn Gram âm được chia thành hai nhóm lớn. Tất cả các loài oxidase âm tính được xếp vào họ *Enterobacteriaceae*. Các trực khuẩn Gram âm còn lại gồm nhiều họ khác nhau được xếp chung vào nhóm "các vi khuẩn Gram âm hỗn hợp (miscellaneous gram-negative bacteria)". Các tính trạng của các loài khác nhau thuộc họ này được liệt kê ở bảng II-1, các biến thể trong một loài đồng nhất biểu hiện một số tính trạng khác biệt được coi là các dạng sinh học (biovar) hoặc dạng hóa học (chemovar).

Phản ứng catalase xảy ra dễ dàng không cần có yếu tố hữu cơ nhận oxy (organic oxygen receptor) như trong phản ứng peroxidase, và rất đơn giản: Cho H_2O_2 3% lên khuẩn lạc (tập *lạc* của vi *khuẩn* hoặc chân *khuẩn*) đã quệt trên phiến kính hoặc giấy thấm, nếu thấy sủi bọt trong vòng 10 giây chứng tỏ phản ứng dương tính.

Để kiểm tra **phản ứng oxidase** ta lấy khuẩn lạc quệt (bằng góc phiến kính hay tăm tre hay tăm gỗ, không dùng que cấy kim loại vì có thể cho phản ứng dương tính giả) lên giấy thấm đặt trên một phiến kính rồi làm ướt giấy đó bằng thuốc thử oxidase chế bằng cách hòa 10 mg diethyl- (hoặc tetramethyl-) p-phenylenediamin

HCl vào 1 ml nước cất (tránh ánh sáng, có thể cất được 2 - 3 ngày). Có thể nhỏ từng giọt thuốc thử này lên khuẩn lạc trong đĩa Petri hoặc tấm thuốc thử vào giấy thấm, sấy khô trong không khí ở chỗ tối, đậy kín, khi dùng thì bôi khuẩn lạc lên rồi làm ướt giấy. Các trực khuẩn đường ruột có phản ứng oxidase âm tính: khuẩn lạc không chuyển sang màu tím đen trong vòng 10 giây.

Môi trường kiểm nghiệm hoàn nguyên nitrate được chế bằng cách hòa 3 g chất chiết thịt bò (cao thịt: beef extract), 5 g Bacto peptone và 1 g KNO₃ vào 1 lít nước cất, chỉnh đến pH 7,3 - 7,4, rót khoảng 5 ml mỗi ống đã đặt một ống Durham lộn ngược và hấp áp suất cao ở 115 °C trong 20 phút (chú ý: phải để nước sôi khoảng 5 - 10 phút để đẩy hết khí ra khỏi ống Durham rồi mới đóng van tăng áp suất sôi). Sau khi cấy 24 giờ (thông thường) hoặc 3 ngày (tiêu chuẩn) thì kiểm tra khí trong ống Durham, rồi cho vào ống 0,1 ml dung dịch A (chế bằng cách hòa tan nhờ đun nóng nhẹ 8 g acid sulphanilic vào acid acetic 5 N [hòa 300 ml acid acetic đậm đặc với 700 ml nước], [cất giữ ở 4 °C]) và 0,1 ml dung dịch B (chế bằng cách hòa tan 5 g α -naphthylamine [hoặc dimethyl α -naphthylamine] vào 1 lít acid acetic 5 N), và quan sát sự chuyển màu trong 1 phút, nếu không có chuyển màu thì phản ứng có thể là âm tính hoặc dương tính nhưng nitrate đã chuyển hết thành N₂ (hơi trong ống Durham) cần xác nhận sự hiện diện của nitrate bằng cách cho bột kẽm vào ống phản ứng. Màu đỏ với bột kẽm xuất hiện, chứng tỏ có nitrate, chỉ phản ứng âm tính.

Về cấu trúc kháng nguyên, các loài, loài phụ (hay á loài: subspecies) biểu hiện tính chất nhất định. Nói chung có các kháng nguyên thân (kháng nguyên O) chịu nhiệt và kháng nguyên lông (lông roi, hay tiêm mao: flagellum) (kháng nguyên H) không chịu nhiệt và kháng nguyên nhung mao (lông nhung: fimbria hay pili) (kháng nguyên F) chịu nhiệt ở mức trung gian. Phụ thuộc vào đặc tính kháng nguyên mà các biến thể trong cùng loài hoặc dưới loài (á loài) được gọi là các dạng/type huyết thanh học (serovar).

Kháng nguyên O (xuất phát từ chữ Ohne Hauch - không có màng hơi) là các hợp chất lipopolysaccharide có trong thành phần vách tế bào, là chất gây sốt rất độc đối với động vật, chịu nhiệt (100 °C, hơn 2 giờ), không bị ethanol 50° phá hủy nhưng bị formol 0,5% làm biến tính. Các kháng nguyên thân đều nằm trên bề mặt nên có thể tiếp xúc với hệ thống miễn dịch của cơ thể động vật trừ một số trường hợp bị kháng nguyên bề mặt che lấp. Khi trộn kháng nguyên thân với kháng thể tương ứng, thì xuất hiện phản ứng ngưng kết gọi là ngưng kết O: thân tế bào vi khuẩn dính với nhau, hình thành những hạt nhỏ lặn rất khó tan, huyền dịch vi khuẩn trong.

Kháng nguyên H (xuất phát từ chữ Hauch - màng hơi) là những phân tử protein flagellin gần giống myosin trong cơ của động vật, không chịu nhiệt, dễ bị ethanol 50° và enzyme proteinase phá hủy, nhưng bảo tồn trong formol 0,5%. Khi gặp kháng thể tương ứng, kháng nguyên H hình thành ngưng kết gọi là phản ứng lên bông do các tế bào vi khuẩn dính nhau gián tiếp qua các lông roi nên hình thành các khối nhỏ không bền, dễ vỡ khi lắc.

Kháng nguyên K (xuất phát từ chữ Kapsule - vỏ bọc) là kháng nguyên bao bọc thân vi khuẩn. Tuy gọi là kháng nguyên vỏ nhưng về mặt hình thái học lại có nguồn gốc từ những hợp chất có trên bề mặt tế bào chứ không phải trong thành phần của vỏ nhầy. Điều đáng chú ý là những kháng nguyên này ức chế phản ứng ngưng kết O rất mạnh, vì vậy khi thí nghiệm với các kháng thể O phải rất lưu ý.

Bảng I-1. Các tính trạng giám biệt của các chi chủ yếu họ trực khuẩn đường ruột

Chi Tình trạng		<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Morganella</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Tatumella</i>	<i>Cedecea</i>
Nhiệt độ tối thích (°C)		35 - 37										25 - 30			35 - 37			
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoàn nguyên nitrate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+
Sinh indol		+	D	D	-	+	D	-	-	+	D	+	+	D	D	+	-	-
Phản ứng MR		+	+	D	+	+	D	-	-	-	+	+	+	+	V	+	-	+
Phản ứng VP		-	-	-	-	-	+	+	V	+	D	-	-	D	+	-	-	+
Simon's citrate		-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	D	+	-	+
Sinh H ₂ S		-	-	D	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Di động		+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Urease		-	-	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Gelatinase		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Phenylalanine deaminase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	D	-	+	-
Lysine decarboxylase		+	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	-	+	V	V	-	-
Arginine dehydrogenase		-	V	-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V
Ornithine decarboxylase		V	+	+	+	V	-	+	+	D	D	-	+	D	V	+	-	-
DNase		-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-	-	D	-	-	-	-
Lipase		-	-	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-	V	-	-	+
Mọc ở 0.0075% KCN		-	-	-	+	D	+	V	+	V	+	+	+	-	-	+	-	+
Sử dụng malonate		+	-	-	-	+	D	+	D	V	+	-	-	-	-	+	-	+
ONPG		+	D	-	D	+	V	+	+	+	-	-	-	V	+	+	-	+
Glucose	(acid)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(hơi)	+	-	D	+	+	+	+	+	+	V	V	V	V	-	+	-	+
Lactose		+	+	-	+	V	+	V	-	V	-	-	-	V	+	+	-	V
Saccharose		D	+	D	+	V	V	+	V	V	V	V	-	D	+	+	+	D
D-mannit		+	D	D	+	+	+	+	+	+	-	D	-	+	+	+	-	+
D-adonit		-	-	-	-	V	+	V	-	V	-	D	-	-	-	-	-	-
D-sorbit		D	V	-	D	+	+	D	-	+	-	-	-	D	+	V	-	-
Hàm lượng G+C (mol%)		50 - 51	50 - 52	50 - 51	50 - 53	50 - 52	53 - 58	52 - 60	48 - 49	52 - 60	38 - 41	40 - 42	50	50	50 - 58	55	53 - 54	48 - 52

Ghi chú: +, 90% trở lên dương tính; -, 90% trở lên âm tính; V, phản ứng không ổn định; D, phản ứng phụ thuộc loài; +^d hay -^d, một số loài ngoại lệ dương tính hay âm tính.

Kháng nguyên K biết rõ nhất là Vi ở *Salmonella* (virulence: độc tính, do kháng nguyên này chỉ có khi vi khuẩn mới phân lập từ cơ thể bệnh), kháng nguyên M (từ chữ mucoid, ức chế phản ứng ngưng kết O và ngưng kết H) kháng nguyên "5" giống kháng nguyên thân và không ức chế phản ứng ngưng kết O, kháng nguyên L, A và B ở *Escherichia*. Hiện nay, người ta phát hiện được rằng bản chất của nhiều kháng nguyên K là các sợi lông nhung (hay fimbria) nên người ta gọi các kháng nguyên nhóm này là kháng nguyên F (F antigen), vì vậy xuất hiện các ký hiệu F1, F2,...

4. Tính gây bệnh

Các nhân tố gây bệnh ở vi khuẩn họ này gồm có tính kết bám (adhesiveness) vào niêm mạc ký chủ, tính xâm lấn (invasiveness), khả năng sản sinh các độc tố ruột, độc tố

gây chết, tính đề kháng huyết thanh, năng lực sinh sản nội bào. Những đặc tính này hoặc bị chi phối bởi các gene trên nhiễm sắc thể vi khuẩn hoặc bởi các plasmid và thực khuẩn thể (bacteriophage).

II. ENTEROBACTERICEAE VÀ BỆNH TRUYỀN NHIỄM

1. *Escherichia coli*

* **Đặc điểm *Escherichia coli*:** Chi *Escherichia* có 4 loài khác nhau, nhưng loài chủ yếu là *E. coli*. Vi khuẩn này phát triển rất tốt trên môi trường thạch thường, ở 35 - 37 °C sau 12 - 18 giờ hình thành khuẩn lạc tròn, lồi, không trong suốt, bóng láng. Trên thạch máu, đa số chủng không gây dung huyết, nhưng cũng có chủng dung huyết. Để phân lập thường nuôi cấy khởi đầu trên môi trường tuyển lựa như môi trường Istrati, MacConkey, Endo, desoxycholate,...

Môi trường Istrati được chế như sau: Cho vào 100 ml thạch thường (có thể pha bột môi trường chế sẵn NA [nutrient agar base] thương phẩm vào nước cất theo chỉ dẫn trên vỏ lọ, hoặc chế nước thịt peptone (canh thang) [*một phần thịt bò nạc ngâm trong hai phần nước trong 2 giờ ở 50 °C hoặc qua đêm trong tủ lạnh, đun sôi 30 phút rồi lọc và thêm nước cất cho đủ hai phần dịch, rồi thêm peptone 10 g/l và NaCl 5 g/l, điều chỉnh pH về mức 7,2 - 7,4 bằng NaOH 1 N*], và 1% thạch (agar) rồi hấp hơi dưới áp suất cao 15 phút ở 121 °C các chất sau: lactose 1,5 g, mật bò khô (*chế bằng cách lọc mật bò tươi qua giấy lọc ra khay tráng men, sấy 120 °C trong khoảng 30 phút cho giảm lượng thủy phần và khử trùng rồi sấy tiếp ở nhiệt độ 45 °C cho khô, cạo ra và đựng vào lọ nút kín, dùng dần*) 0,8 g, citrate natrium (sodium citrate) 0,8 g, citrate sắt 0,2 g, hyposulfide (thiosulfate) natri ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,85 g, trộn đều rồi đun sôi khoảng 15 phút, chỉnh pH 7,2, rồi cho thêm 2 - 4 ml xanh bromothymol (bromothymol blue) 1% (*chế bằng cách nghiền 1 g bromothymol blue trong cối sứ, nhỏ từng giọt NaOH 0,1 N cho đến 25 ml rồi thêm nước cất vừa đủ 100 ml, cho vào lọ, nút kín dùng dần*) đến khi môi trường có màu đỏ úa vàng ở khoảng 50 °C. Lại đun sôi 15 phút, để nguội đến 50 °C rồi rót hộp lồng (đĩa) Petri. Để đĩa trên mặt phẳng khoảng 15 phút cho thạch rắn lại rồi mở nắp hộp mà hong cho mặt thạch ráo nước (khoảng 10 - 15 phút, trong buồng vô trùng) rồi cho vào bao polyethylene để tránh cho thạch khô khi bảo quản mà bảo quản ở khoảng 1 - 8 °C (thường sau khi để qua đêm ở nhiệt độ 37 °C để kiểm tra vô trùng, loại bỏ các đĩa bị ngoại nhiễm).

Sau khi nuôi cấy vào môi trường, ủ ở 37 °C qua 24 giờ thì lấy ra đọc kết quả. *E. coli* lên men đường lactose nên khuẩn lạc ban đầu có màu vàng nhạt sau để lâu có màu xanh lục. Do vi khuẩn này không sản sinh H_2S nên khuẩn lạc không chuyển sang màu đen (như các *Proteus*).

Để chế **môi trường MacConkey**, người ta hòa 20,0 g peptone, 10,0 g lactose, 1,5 g mật khô (hoặc 2,0 g desoxycholate natri), 0,03 g đỏ trung tính (neutral red), 0,0001 g tím kết tinh [crystal violet], 5,0 g NaCl và 14 g agar vào 1 lít nước cất, đun nóng cho tan, điều chỉnh pH 7,2 - 7,4, hấp tiệt trùng (nếu cần bảo quản lâu) ở 121 °C trong vòng 15 phút, đổ đĩa, hong ráo mặt thạch, có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng hay tủ lạnh 4 °C. (Có thể dùng 0,075 g neutral red thay thế cho 0,03 g neutral red và 0,0001 g crystal violet nêu trên).

E. coli phân giải đường lactose nên khuẩn lạc có màu đỏ sau khoảng 18 - 24

giờ nuôi cấy. Các vi khuẩn không lên men lactose có khuẩn lạc không màu. Vi khuẩn Gram dương không phát triển trên môi trường này.

Để chế **môi trường thạch desoxycholate** ta hòa 10 g peptone, 10 g lactose, 5,0 g NaCl, 2,0 g K₂HSO₄, 1,0 g citrate sắt II, 1,0 g citrate natri, 1,0 g desoxycholate natri, 16 g agar và 0,033 g neutral red vào 1 lít nước cất, chỉnh đến pH 7,3, đun cho tan chảy và trộn đều các thành phần, rót ra các đĩa lòng petri mà không cần hấp khử trùng cao áp. Khi phát triển, *E. coli* hình thành khuẩn lạc to, màu đỏ (trái với *Shigella* và *Salmonella* có các khuẩn lạc không màu).

Môi trường KIA (Kligler's iron agar: thạch sắt Kligler) và TSI (triple sugar iron: môi trường ba đường - sắt) là những môi trường thường dùng để cấy chuyển sau khi đã có lựa chọn thuần khiết từ các môi trường thạch nêu trên. Để chế môi trường KIA, hòa 20 g peptone, 3 g cao thịt, 3 g cao men, 10 g lactose, 1 g glucose, 5 g NaCl, 0,5 g citrate sắt ammon, 0,5 g thiosulfate natri, 15 g agar và 0,025 g đỏ phenol (phenol red) vào 1 lít nước, đun cho tan đều, chỉnh (nếu cần) pH đến 7,4, rót vào các ống nghiệm nhỏ một lượng đủ lớn, hấp cao áp khử trùng ở 121 °C trong 15 phút, để nguội ở tư thế nghiêng ống sao cho khi thạch hóa rắn ta có phần nghiêng và phần đáy khá cao. Sau khi cấy vi khuẩn bằng cách chọc vào phần đáy và ria phết phần nghiêng và ủ một đêm có thể thấy một số tính trạng như sau: lên men lactose làm cả phần nghiêng lẫn phần đáy chuyển sang màu vàng (trường hợp VP dương tính thì phần nghiêng có thể trở lại màu hồng), nếu vi khuẩn chỉ lên men glucose thì chỉ phần đáy có màu vàng, nếu vi khuẩn sinh hơi thì lớp agar thường bị nứt nẻ và bị đẩy lên, nếu hình thành H₂S thì phần đáy chuyển sang màu đen.

Bảng I-2. Tính trạng giám biệt của các loài chủ yếu thuộc chi *Escherichia*

Loài	Tình trạng													Tính gây bệnh (gia súc, gia cầm và người)	
	Indol	Citrate	Di động	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	KCN (0,0075%)	Sử dụng malonate	Glucose (acid)	Glucose (hơi)	Lactose	Saccharose	Mannit	Adonit		Sorbit
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	V	-	-	+	+	+	V	+	-	+	Gây bệnh đường ruột Xâm nhập đường ruột Sinh độc tố đường ruột Sinh độc tố tế bào vero
<i>E. fergusonii</i>	+	V	+	+	+	-	V	+	+	V	-	+	+	-	Phân lập từ bệnh phẩm
<i>E. hermannii</i>	+	V	+	-	+	+	-	+	+	V	+	V	-	-	từ bệnh phẩm, thực phẩm
<i>E. vulneris</i>	+	V	+	-	+	+	-	+	+	V	V	+	-	-	từ bệnh phẩm, thực phẩm

Ghi chú: V, phản ứng không ổn định.

Tính trạng của *E. coli* là indol dương tính, methyl red (MR) dương tính, Voges-Proskauer (VP) âm tính, phản ứng sử dụng citrate âm tính, phản ứng sinh H₂S âm tính, di động dương tính, lysine decarboxylase dương tính, lên men lactose và mannit. Hàm lượng G+C (mol%) là 50 - 51%.

Hiện tại, kháng nguyên của chi *Escherichia* được biết gồm trên 167 loại kháng nguyên O,

72 loại kháng nguyên K, 54 loại kháng nguyên H và 12 loại kháng nguyên F.

Indol hình thành trong môi trường nhờ phân giải tryptophan (do thêm vào môi trường dưới dạng tinh chế hoặc do phân giải peptone) được phát hiện bằng **thuốc thử Ehrlich** (*p*-dimethyl aminobenzaldehyde) nhưng trong phương pháp tiêu chuẩn phải dùng thuốc thử **Covač**. Để có môi trường thử indol ta hòa 10 g peptone và 5 g NaCl vào 1.000 ml nước cất, chỉnh đến pH 7,2 - 7,4 rót vào ống hẹp rồi khử trùng ở 121 °C trong 20 phút.

Để thử sự hiện diện của indol, ta cho 0,2 ml **thuốc thử Covač** (*chế bằng cách hòa tan, nhờ hơi nóng nhẹ, 5 g p-dimethyl aminobenzaldehyde vào 75 ml isoamyl alcohol, sau đó cho thêm một lượng acid HCl đậm đặc bằng 1/3 thể tích dung dịch đó. Dung dịch này có thể bảo quản tránh ánh sáng được 2 tháng*) rồi lắc đều với canh khuẩn. *E. coli* phát triển hình thành indol làm cho lớp thuốc thử có màu đỏ đậm (ngược với màu vàng nhạt trong phản ứng âm tính).

Môi trường thử MR-VP được chế bằng cách pha 7 g peptone, 5 g glucose và 5 g K₂HPO₄ vào 1 lít nước, chỉnh pH 7,5, rót vào ống hẹp 2 - 3 ml rồi hấp khử trùng dưới áp suất cao 115 °C trong vòng 20 phút. **Thuốc thử MR** được chế bằng cách hòa tan 0,25 g đỏ methyl (methyl red) vào 100 ml ethanol. Sau khi nuôi cấy vi khuẩn 2 ngày (thông dụng) hoặc 4 ngày (tiêu chuẩn) ở 37 °C, lấy ra nhỏ 1 giọt thuốc thử MR. *E. coli* có phản ứng MR dương tính làm ống có màu đỏ (pH duy trì dưới 4,5) sau và tiếp tục giữ màu đỏ đó sau một thời gian nuôi cấy nữa (trái với các vi khuẩn MR âm tính ống nghiệm có màu vàng, hoặc nếu đỏ thì cũng chuyển vàng sau khi nuôi cấy tiếp, ví dụ *Serratia marcescens*).

Phản ứng VP được thực hiện sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường MR-VP 2 (thông dụng) hoặc 4 (tiêu chuẩn) ngày, bằng cách nhỏ 0,6 ml dung dịch α -naphthol trong cồn tuyệt đối (5 g α -naphthol, 100 ml ethanol tuyệt đối [*chế bằng cách cho sulfate đồng khan nhờ nung qua đêm ở 160 °C cho đến khi có màu trắng vào một lọ có nút kín rồi rót ethanol 95° hoặc 99° vào, chú ý tính sao cho lượng Cu(OH)₂ dư để hút hết nước trong cồn và chuyển thành Cu(OH)₂.5H₂O có màu xanh*], dung dịch có màu rom đậm) và 0,2 ml dung dịch KOH (KOH 40 g, nước cất 100 ml). Đặt nghiêng ống rồi đọc kết quả sau 15 và 60 phút. *E. coli* có phản ứng VP âm tính: không có phản ứng màu, đôi khi có màu đồng hay hồng nhạt (trái với VP dương tính, màu ống chuyển sang đỏ đậm, ví dụ *Enterobacter cloacae*).

Môi trường citrate có hai loại nhưng thường dùng môi trường ammonium citrate của Simmon (Simmon's citrate). Môi trường này được chế bằng cách hòa 5 g NaCl, 1 g NH₄H₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 2 g sodium citrate và 9 g agar vào 1 lít nước, thêm 40 ml dung dịch 0,2% bromothymol blue (xanh bromothymol, *chế bằng cách hòa 2 g bromothymol blue vào 50 ml NaOH 0,1 N và 950 ml nước cất*), chỉnh pH 6,8, rót ra ống rồi khử trùng ở 115 °C trong 20 phút, đặt nghiêng chờ nguội để có môi trường đặc với phần đáy ngắn và phần nghiêng dài. Cây lượng nhỏ vi khuẩn và ủ đến 4 ngày. *E. coli* không mọc và không làm thay đổi màu xanh lục của môi trường (ngược với *Citrobacter freundii*, chẳng hạn, mọc và chuyển môi trường sang màu xanh dương).

* **Bệnh cảm nhiễm *Escherichia coli***: Vi khuẩn *E. coli* gây viêm ruột, tiêu chảy ở người và các loại động vật khác nhau được gọi là *E. coli* sinh tiêu chảy (diarrhogenic *E. coli*), ở người được chia thành 4 nhóm lớn:

Bảng I-3. Các dạng huyết thanh, tính sinh độc tố và tính kháng nguyên của *E. coli*

Ký chú	Dạng huyết thanh học	Độc tố			Bệnh trạng
		LT	ST	VT	
Bò	O8:K85:H-F5	-	+	-	Bệnh do <i>E. coli</i> bê nghé sơ sinh (tiêu chảy, viêm dạ dày - ruột, bệnh trúng độc huyết đường ruột (enterotoxemia), viêm vú
	O9:F5	-	+	-	
	O20:K+:H-F5	-	+	-	
	O101:K28:H-F5	-	+	-	
	O115:F5	-	+	-	
	O26	-	-	+	
	O111	-	-	+	
	O119	-	-	+	
	O141:H4	-	-	+	
	O157:H7	-	-	+	
Lợn	O8:K87:H-F4	+	+	-	Bệnh <i>E. coli</i> lợn con sơ sinh (tiêu chảy phân trắng) Bệnh <i>E. coli</i> lợn sau cai sữa (viêm dạ dày - ruột, tiêu chảy)
	O149:H10:F4	+	+	-	
	O149:F5	+	+	-	
	O157:F4	+	+	-	
	O78:F4	+	-	-	
	O101:F4	+	-	-	
	O149:H10:F4	+	-	-	
	O9K103:H-F5	-	+	-	
	O9:K103:H-F6	-	+	-	
	O20:K101:H-F6	-	+	-	
	O101:F41	-	+	-	
	O157:F4	-	+	-	
	O138:H14	-	-	+	Bệnh phù đầu, viêm huyết quản não tủy
	O139:K82:H1	-	-	+	
	O141:H4:F4	-	+	+	Nhiễm khuẩn máu, bại huyết (vi khuẩn phát triển trong máu)
	O2	-	-	-	
	O8	-	-	-	
	O78	-	-	-	
	O114	-	-	-	
	O137	-	-	-	Bại huyết cấp tính, viêm tương mạc á cấp tính, u thịt mỡ tính (đôi khi, viêm ruột xuất huyết)
Gia cầm	O1	-	-	-	
	O2	-	-	-	
	O9	-	-	-	
	O26	-	-	-	
	O78	-	-	-	
Chuột	O115a,c:K(B)	-	-	-	Bệnh phì đại ruột (megaenteron)

Ghi chú: Tính sinh độc tố LT: heat-labile enterotoxin (độc tố đường ruột không chịu nhiệt), ST: heat-stable enterotoxin (độc tố đường ruột chịu nhiệt), VT: verocytotoxin (độc tố [gây độc] tế bào vero).

E. coli bệnh nguyên đường ruột (enteropathogenic *E. coli* - EPEC) thuộc vào một nhóm huyết thanh học riêng biệt, có tính kết bám (bám dính).

E. coli xâm lấn đường ruột (enteroinvasive *E. coli* - EIEC) có khả năng xâm nhập đường ruột, do plasmid chi phối.

E. coli độc tố nguyên đường ruột (enterotoxigenic *E. coli* - ETEC) có năng lực hình thành các kháng nguyên lông F2 (tên cũ CFA/I), F3 (CFA/II), F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) và các độc tố ruột (enterotoxin) do plasmid chi phối.

E. coli sinh độc tố tế bào vero (verocytotoxin-producing *E. coli* - VTEC) hay *E.*

coli xuất huyết ruột (enterohemorrhagic *E. coli* - EHEC) có năng lực sản sinh độc tố vero gây độc tế bào do bacteriophage chi phôi. Tất cả các vi khuẩn trên đều gây bệnh cục bộ.

Ngoài ra, đôi khi *E. coli* xâm nhập kết bám và phát bệnh ở các cơ quan khác nhau ngoài đường ruột.

a. Tiêu chảy phân trắng do *E. coli* ở bê nghé (enteric colibacillosis in calves)

Bệnh này do ETEC gây ra ở bê nghé một tuần sau sinh, nhờ có kháng nguyên lông (chủ yếu là kháng nguyên F5 - tức K99) mà vi khuẩn kết bám và sản sinh enterotoxin.

b. Viêm vú do *E. coli* (coliform mastitis)

Trong thời kỳ bò cho sữa *E. coli* trong môi trường có thể xâm nhập vào bên trong bầu vú, phát triển và phát bệnh. Tuy tần suất xuất hiện nhỏ nhưng cũng có nhiều trường hợp viêm vú hoại tử cấp tính và á cấp tính.

Là chứng bệnh do nội độc tố vi khuẩn Gram âm ($>10^7$ pg/ml sữa), viêm vú hoại tử có thể gây ra bởi các vi khuẩn khác, bên cạnh *E. coli*, như *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

c. Bệnh *E. coli* ở lợn (colibacillosis in pigs)

Trong nhóm này gồm bệnh tiêu chảy phân trắng (bach ly) ở lợn con, tiêu chảy (viêm dạ dày - ruột) hay phù mắt ở lợn sau cai sữa, bại huyết (vi sinh vật sinh sản phát triển trong máu), viêm huyết quản não tủy.

Bệnh nguyên gây tiêu chảy là những ETEC khác nhau mang yếu tố kết bám là các kháng nguyên lông (kháng nguyên F4 - tức K88, F5 - K99, F6 - 987P, F41) cùng với các *E. coli* sản sinh các enterotoxin ST-I và ST-II chịu nhiệt, LT-I và LT-II không chịu nhiệt.

d. Bệnh *E. coli* ở gà (colibacillosis in chicken)

Bên cạnh nhiều bệnh trực khuẩn đại tràng ở gà không phải là bệnh ở đường ruột như bại huyết cấp tính, viêm tương mạc á cấp tính, u thịt mỡ, ... đôi khi có bệnh viêm ruột xuất huyết. Bệnh đường ruột do *E. coli* ở gà thường đặc trưng bởi phân nhão, màu xanh thẫm, rất hôi thối ("cứt gà sấp").

e. Bệnh to ruột ở chuột (megaenteron of mice)

Bệnh này do các *E. coli* thuộc dạng huyết thanh học O115a, c:K(B) gây ra ở chuột con cai sữa 2 - 3 tuần tuổi, đặc trưng bởi sự hình thành quá mức của tế bào thượng bì niêm mạc ruột, tiêu chảy dạng nước với tỷ lệ tử vong cao.

2. *Escherichia coli* và trứng độc thực phẩm

Trứng độc (thực ra là chứng tiêu chảy) do *E. coli* khá phổ biến và thường xuất hiện ở tập đoàn người cùng sử dụng một loại thực phẩm nhiễm khuẩn.

Trong đa số trường hợp, sau khi ăn thức ăn nhiễm *E. coli* gây tiêu chảy 10 - 15 giờ thì phát bệnh, đặc trưng bởi nôn mửa, đau bụng, tiêu chảy, phát sốt, hồi phục sau 2 - 3 ngày. Có khi tùy thuộc vào sự gia tăng số lượng vi khuẩn phát triển ở đường ruột và lượng độc tố khuếch tán trong đường ruột mà trứng độc có thời kỳ tiềm ẩn khoảng 6 - 72 giờ, dạng này có thể phân biệt là trứng độc dạng cảm nhiễm. Còn các trường hợp khác sau khi ăn thức ăn nhiễm khuẩn trong cơ thể bắt đầu hình thành độc tố dẫn đến hiện

tượng trùng độc thì gọi là trùng độc độc tố nội sinh. Các *E. coli* sinh bệnh đường ruột (EPEC) do có khả năng kết bám vào tế bào HeLa, cho nên có thể kiểm định *E. coli* kết bám đường ruột (enteroadherent *E. coli* - EAEC) hay *E. coli* liên quan đến tính gây bệnh đường ruột.

Các *E. coli* có tính xâm nhập tổ chức đường ruột gây nên các triệu chứng giống bệnh lỵ (tức kiết lỵ, hay hồng lỵ) trực trùng thường không sản sinh lysine decarboxylase.

Các *E. coli* sinh độc tố (ETEC) có các kháng nguyên lông (kháng nguyên F2 - CFA/I hoặc F3 - CFA/II) và sản sinh enterotoxin nhưng có ba loại là ETEC sản sinh chỉ LT, chỉ ST hoặc cả hai loại LT và ST. Triệu chứng luôn luôn là tiêu chảy như bệnh dịch tả (cholera) do *Vibrio cholerae* gây ra.

Các triệu chứng trùng độc do VTEC thường là tiêu chảy ra máu dạng kiết lỵ và đau bụng dữ dội.

3. *Salmonella* và bệnh truyền nhiễm

* **Đặc điểm:** *Salmonella* là một chi vi khuẩn lớn thuộc họ trực khuẩn đường ruột. Việc phân loại chi này không thống nhất giữa các nhà vi sinh vật học các khu vực khác nhau. Ở nhiều nước, các đại diện *Salmonella* có đặc tính khác nhau thường được coi là các loài khác nhau, và tên vi khuẩn này được viết theo quy tắc "nhị danh" (binomial name) in nghiêng gồm tên chi (có chữ cái đầu viết hoa) và tên xác định loài (viết thường). Chẳng hạn, *Salmonella abortusequi*. Nhưng với Hội sinh vật học một số nước khác thì chi này lại được coi chỉ gồm hai loài là *S. choleraesuis* và *S. bongori* (bảng I-3), trong đó loài đầu gồm 6 loài phụ (subspecies) khác nhau tương ứng với các dạng huyết thanh học khác nhau. Việc đặt tên, do vậy, cũng không thống nhất với danh pháp nói trên. Tên loài phụ in nghiêng gồm tên loài cộng thêm phần phụ sau chữ subsp. (viết tắt của chữ "subspecies") không in nghiêng, chẳng hạn, *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, còn tên gọi theo dạng huyết thanh học lại viết hoa chữ cái đầu và không in nghiêng đặt sau chữ *Salmonella* trực tiếp hoặc thêm chữ serovar không in nghiêng, ví dụ *Salmonella* serovar Typhi hoặc *Salmonella* Typhi. Ngoài *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ra, còn có các loài phụ khác như *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* và *S. choleraesuis* subsp. *indica*. *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (*S. enterica*),... Chúng phát triển tốt trên môi trường thạch thường, ở 35 - 37 °C, sau 20 - 24 giờ hình thành khuẩn lạc tròn từ trong suốt không màu đến hơi đục, hơi lồi hoặc có dạng giọt sương, bóng láng. Để nuôi cấy phân lập thường dùng môi trường tuyển lựa như thạch MacConkey, SS, EMB,... hoặc là sau khi nuôi cấy bồi dưỡng trong môi trường 50% dịch mật (bò, lợn,...) rồi dùng môi trường tuyển lựa để nuôi cấy khởi đầu để phân lập.

Salmonella có phản ứng indol âm tính, MR âm tính, VP âm tính, sử dụng citrate dương tính, hoàn nguyên nitrate dương tính, di động, lysine decarboxylase dương tính, adonit âm tính, lên men mannit, thường không lên men lactose, saccharose trừ một số ngoại lệ dạng huyết thanh học, dạng sinh học nhất định. Hàm lượng C+G (mol%) là 50 - 53.

Môi trường SS được chế bằng cách hòa 5 g cao thịt, 5 g peptone, 10 g lactose, 8,5 g desoxycholate natri, 8,5 g citrate natri, 1 g citrate sắt, 2,5 ml neutral red 1%, 0,33 ml lục sáng (brilliant green) 0,1%, và 13, 5 g agar vào 1 lít nước rồi đun sôi cho tan, không cần khử trùng bằng cao áp, đồ đĩa Petri. *Salmonella* và *Shigella* phát triển tạo khuẩn lạc không màu, còn các vi khuẩn lên men lactose

thường bị ức chế, nếu có phát triển thì có màu mận chín hoặc màu đỏ. Vi khuẩn sản sinh H_2S có thể hình thành khuẩn lạc màu đen. Các vi khuẩn Gram dương thì phát triển được trên môi trường này.

Môi trường thạch EMB (eosine-methylene blue agar) được chế bằng cách hòa 10 g peptone, 10 g lactose, 2 g K_2HPO_4 , 0,2 g eosine Y, 0,5 g xanh methylene (methylene blue) và 15 g agar vào 1 lít nước, chỉnh pH 6,8, hấp cách thủy khử trùng 15 phút ở 121 °C, rót đĩa Petri để nguội cho thạch hóa rắn. Môi trường có màu đỏ hồng. Trên môi trường này *E. coli* có khuẩn lạc hơi nhỏ, màu lông chuột hoặc đen tím có ánh kim. Các vi khuẩn lên men lactose như *Klebsiella* có khuẩn lạc lớn, màu xanh lam không có ánh kim. Vi khuẩn không lên men lactose, như *Salmonella*, không làm thay đổi màu của môi trường, khuẩn lạc có màu đỏ hồng của môi trường.

Môi trường Endo được chế bằng cách đun chảy 100 ml thạch Martin (*lấy dạ dày lợn hoặc dạ cỏ bò tươi mới, rửa sạch, cắt bỏ mỡ, gân, xay nhỏ, thêm 4 lần thể tích nước, rồi thêm 1% thể tích HCl, ngâm qua đêm ở nhiệt độ 50 °C, trung hòa bằng dung dịch NaOH 20% đến khi có phản ứng kiềm, hấp cao áp khử trùng ở 120 °C trong 15 phút, hòa với lượng tương đương nước thịt cơ bản, đun sôi 10 phút, kiềm hóa bằng NaOH 20% đến pH 7,9, đun sôi 30 phút, lọc, thêm 2% agar rồi hấp cao áp ở 110 trong 30 phút*) để nguội 70 °C thì hòa vào đó 1 g lactose, rồi 0,5 ml fuchsine kiềm bão hòa trong cồn ethanol 95°, và 2,5 ml dung dịch thiosulfate natri (sodium thiosulfate) 10%, lắc đều. Đổ ra đĩa Petri, để nguội cho thạch hóa rắn. Lúc đầu môi trường có màu hồng nhưng khi nguội sẽ nhạt màu. *Salmonella* phát triển hình thành khuẩn lạc màu vàng, *E. coli* có khuẩn lạc màu đỏ.

Các **phản ứng arginine, lysine, ornithine decarboxylase** chuyển môi trường về phía kiềm tính làm trung hòa acid sinh ra trong quá trình lên men nên nhất thiết phải có ống đối chứng bên cạnh các ống có một trong ba loại amino acid nêu trên. **Môi trường amino acid-decarboxylase** (Møller) được chế bằng cách hòa 5 g peptone, 5 g beef extract, 0,005 g pyridoxal, 0,5 g glucose, 2,5 ml dung dịch đỏ cresol (cresol red) 0,2% và 5 ml tía bromocresol (bromocresol purple) 0,2% vào 1 lít nước cất, pH 6,0, thêm amino acid (loại này hay loại khác) cho đủ 1% rồi hấp cao áp 10 phút ở 115 °C. (*Dung dịch bromocresol purple và cresol red pha bằng cách nghiền 2 g chất màu trong 50 ml NaOH 0,1 N rồi thêm 950 ml nước cất, đóng chai, nút kín để dùng dần*). Trước khi làm thí nghiệm thì rót lượng nhỏ (1 - 2 ml) môi trường vào các ống nghiệm nhỏ vô trùng, thêm một lớp dày (5 mm) parafin lỏng vô trùng, cấy vi khuẩn bằng cách đâm que cấy xuyên qua lớp parafin lỏng. Ngoài môi trường này còn có thể dùng **môi trường Falkow** (5 g peptone, 3 g cao men, 1 g glucose, 0,02 g bromocresol purple, 1 lít nước) thay thế. Phản ứng kiềm tính làm cho môi trường chuyển sang màu tím còn phản ứng acid làm môi trường chuyển sang màu vàng.

Để kiểm tra các **phản ứng lên men đường** của vi khuẩn, người ta thường dùng các dây ống **nước peptone** pH 7,1 - 7,3 có hàm lượng peptone thấp để lượng NH_4 sinh ra do phân giải amino acid không đủ để trung hòa lượng acid sản sinh ra (2 g bacto peptone, 5 g NaCl, 0,3 g K_2HPO_4 hòa vào 1 lít nước), thêm đường (loại này hay loại khác) đủ 0,5%. **Nước peptone đường** (môi trường Barsiekow) có thể chế bằng cách hòa 0,5 g đường và 1,2 ml bromothymol blue 0,2% vào 100 ml nước peptone, phân ra ống rồi hấp ba lần mỗi lần 1 giờ ở nhiệt độ 100 °C để diệt khuẩn, **hoặc tốt hơn** là hấp cao áp khử trùng riêng nước peptone đã pha bromothymol blue

(1,2 ml/l) hoặc thuốc thử Andrade 10 ml/l (*Andrade's indicator*: hòa 5 g acid fuchsine vào 1 lít nước cất và 150 ml NaOH 1 N, để ở nhiệt độ phòng, có lắc thường xuyên, rồi thêm NaOH 1 N để thuốc thử mất màu từ đỏ sang vàng rom) trong ống nghiệm có đặt sẵn ống Durham lộn ngược, còn đường tinh khiết các loại được pha thành dung dịch 10% (hoặc 5% đối với đường tan kém, để kết tủa khi bảo quản ở tủ lạnh), lọc qua màng lọc vi khuẩn, cất ở 4 °C, trước khi làm thí nghiệm thì pha vào nước peptone trong ống nghiệm vô trùng để có hàm lượng đường 0,5%. Vi khuẩn lên men đường làm môi trường chuyển từ màu lục sang màu vàng rồi màu xanh (đối với bromothymol blue) hoặc chuyển từ màu đỏ sang màu vàng (đối với chỉ thị màu Andrade).

Môi trường TSI: hòa 3 g cao thịt, 3 g cao men, 15 g peptone, 5 g proteose, 5 g NaCl, 10 g lactose, 10 g saccharose, 1 g glucose, 1 g FeSO₄.7H₂O (sulfate sắt II), 0,2 g Na₂S₂O₃.5H₂O (thiosulfate natri), 12 g agar và 0,024 g phenol red vào 1 lít nước cất, đun cho tan đều, chỉnh pH 7,4, rót ống khoảng 5 - 6 ml khi nóng, khử trùng ở 100 °C trong 15 phút, đặt ống nằm nghiêng để có phần nghiêng và phần đáy khi môi trường trở nên rắn. Môi trường có màu đỏ. Cây bằng cách chọc sâu vào tâm phần đáy và phết bề mặt phần nghiêng. Sau khi ủ ấm, kết quả sinh hóa tương tự như ở môi trường KIA.

Môi trường Drigalsky được chế bằng cách thêm vào 1 lít môi trường thạch thường 10 g lactose và 40 ml bromothymol blue 0,2%, chỉnh pH đến 7,2 - 7,4. Tiệt trùng cao áp 15 phút ở 121 °C, đổ đĩa Petri. Vi khuẩn phân giải lactose tạo khuẩn lạc màu vàng, *Salmonella* không phân giải lactose nên tạo khuẩn lạc không màu (màu môi trường).

Hiện tại, chi *Salmonella* có 67 loại (có tài liệu công bố tới 80 loại) kháng nguyên O, 94 loại kháng nguyên H lớp 1, hơn 11 kháng nguyên H lớp 2, kháng nguyên K là kháng nguyên Vi (thường chỉ phát hiện được khi vi khuẩn mới được phân lập từ bệnh phẩm động vật), nhưng một bộ phận kháng nguyên do thực khuẩn thể chi phôi (bảng I-6). Trong loài phụ *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* có nhiều dạng huyết thanh học (serovar) khác nhau, phân biệt dựa vào phối hợp kháng nguyên O và kháng nguyên H. Trong cảm nhiễm *Salmonella*, có các loại ký chủ động vật khác nhau phụ thuộc vào dạng huyết thanh học của vi khuẩn gây bệnh. Dựa vào đó người ta chia vi khuẩn này thành 4 nhóm sinh học khác nhau.

Nhóm 1 gồm các chủng *Salmonella* gây ở một số động vật nhất định bệnh thương hàn (typhus) hay bại huyết (vi khuẩn xâm nhập và phát triển ở trong máu), trong nhiều trường hợp vi khuẩn có tính kết bám tế bào (nhờ nhung mao - pili, fimbria), tính xâm lấn (nhờ gene *invA-E*) và tính sinh sản nội bào, hoặc ở một số khác gây bệnh phó thương hàn nhờ tính đề kháng huyết thanh, tính sinh sản nội tế bào hệ lưới nội bì, tính sinh độc tố gây chết. Nhóm này gồm có *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A (gây bệnh thương hàn hoặc phó thương hàn ở người), *S. Gallinarum*-*Pullorum* (tiêu chảy - bạch ly ở gà con, thương hàn ở gà trưởng thành), *S. Abortusequi* (phó thương hàn, bại huyết hoặc sảy thai (lưu sản) truyền nhiễm ở ngựa), *S. Abortusovis* (phó thương hàn ở cừu non, bại huyết hoặc sảy thai truyền nhiễm ở cừu),...

Nhóm 2 gồm các chủng *Salmonella* bên cạnh gây bệnh thương hàn ở một số động vật nhất định còn gây bệnh viêm dạ dày - ruột cấp tính hoặc bại huyết ở động vật. *Salmonella* Paratyphi B (thương hàn ở người), *S. Typhimurium* (thương hàn ở chuột),

(phổ thương hàn ở bò và chuột), *S. Choleraesuis* (tiêu chảy ở lợn), *S. Typhisuis* (thương hàn lợn), *S. Dublin* (salmonellosis ở bò). Trong cả hai nhóm 1 và 2 đều có vi khuẩn chứa plasmid quyết định tính gây bệnh đặc trưng type huyết thanh học (bảng I-6).

Nhóm 3 gồm các *Salmonella* không thuộc dạng huyết thanh học nêu trên, không có tính đặc hiệu ký chủ, nhưng gây bệnh viêm dạ dày - ruột cấp tính ở người và chó.

Nhóm 4 gồm các *Salmonella* trừ *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, trung tâm là *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae* gây bệnh ở động vật máu lạnh.

Thông thường để phân lập *Salmonella*, do lượng vi khuẩn trong bệnh phẩm thường ít và thường bị các loại vi khuẩn khác áp đảo, người ta thường phải nuôi cấy trong các **môi trường chọn lọc tăng sinh *Salmonella*** trước khi nuôi cấy vào môi trường khởi đầu. Môi trường Muller Kauffman và môi trường selenite thường được sử dụng vì mục đích này. Môi trường **Muller Kauffman** được chế bằng cách pha 5 ml mật bò, 1 ml dung dịch malachite green (hoặc lục sáng - brilliant green) 0,1%, 2 ml dung dịch iodine (iốt) (20 g I, 25 KI g, 100 ml nước) và 10 ml dung dịch thiosulfate natri 50%, rồi lọc qua màng lọc hay nén lọc vi khuẩn để có dịch lọc vô trùng. Mặt khác, hòa 5 g CaCO₃ vào 90 ml nước thịt thường pH 7,5, hấp cao áp khử trùng, để nguội, trước khi dùng thì pha dịch lọc nêu trên, rót ống 3 - 5 ml. Sau khi vi khuẩn mọc trong môi trường này thì cấy chuyển sang các môi trường nuôi cấy khởi đầu như SS, MacConkey, Istrati, Endo, EMB, Drigalsky, Kristensen hay Wilson Blaire,...

Môi trường selenite: hòa 5 g peptone, 4 g lactose, 10 g Na₂HPO₄ và 4 g natri bi-selenite (NaHSeO) vào 1 lít nước, chỉnh pH đến 7,2, rót ống 10 - 15 ml, đun tiệt trùng ở 100 °C trong vòng 15 phút. Khi nuôi cấy thì cho vào một lượng bệnh phẩm khoảng 1/10 đến 1/5 môi trường. Môi trường này tuyển chọn bồi dưỡng *Salmonella*.

Môi trường Wilson Blaire được chế bằng cách trộn 0,05 g cao thịt (beef extract), 1 g peptone vào 100 ml nước cất, sửa pH đến 7,4, đun sôi, thêm 2 g agar, đun tiếp cho thạch tan đều rồi hấp cao áp 120 °C tiệt trùng. Đưa ra duy trì nhiệt ở 80 °C, cho 2 g natri sulfide, 0,5 g glucose, 2,5 ml dung dịch chỉ thị bismuth (*chế bằng cách hòa 12 g bismuth citrate vào 96 ml nước cất rồi thêm 4 ml nước ammoniac 28%, giữ trong lọ nút kín*), đun cách thủy 2 - 3 phút. Thêm vào 5 ml dung dịch Na₂HPO₄ 10%, 0,05 g sulfate sắt và 0,25 ml dung dịch brilliant green 1%. Trộn đều, đổ ra các đĩa Petri. Lục sáng ngăn trở sự phát triển của các vi khuẩn Gram dương. *E. coli* bị ngăn trở phát triển bởi bismuth citrate và natri sulfide, khuẩn lạc lồi, ướt, lúc đầu trong suốt sau chuyển sang màu nâu. *Proteus* có khuẩn lạc màu lục sẫm. *Salmonella* sinh H₂S nên khuẩn lạc có màu đen do phản ứng với môi trường tạo FeS. Sau 48 giờ nuôi ở 37 °C thì vi khuẩn này mới mọc tốt. Bismuth kim loại hình thành có màu óng ánh.

* **Bệnh cảm nhiễm *Salmonella*:** xảy ra ở nhiều loại động vật khác nhau, từ người đến các động vật máu lạnh.

a. Bệnh phổ thương hàn ở bê nghé (paratyphus)

Bệnh này còn gọi là bệnh do salmonella ở bê nghé (salmonellosis in calves), gây ra ở bê nghé trong vòng 6 tháng tuổi ở dạng viêm dạ dày - ruột. Tác nhân gây bệnh chủ