

**ỦY BAN NHÂN DÂN TỈNH ĐỒNG THÁP
TRƯỜNG CAO ĐẲNG NGHỀ ĐỒNG THÁP**



**GIÁO TRÌNH
MÔN HỌC: VI SINH VẬT THÚ Y
NGÀNH, NGHỀ: THÚ Y
TRÌNH ĐỘ: TRUNG CẤP/CAO ĐẲNG**

(Ban hành kèm theo Quyết định số 257/QĐ-TCĐNĐT-ĐT ngày 13 tháng 07 năm 2017
của Hiệu trưởng trường Cao đẳng Nghề Đồng Tháp)

Đồng Tháp, năm 2017

LỜI GIỚI THIỆU

Nhằm đáp ứng yêu cầu giảng dạy chương trình cao đẳng thú y, tôi đã tiến hành biên soạn giáo trình “Vi sinh vật học thú y”. Đây là tài liệu quan trọng giúp cho sinh viên nghiên cứu trước và sau khi học trên lớp. Giáo trình này không những phục vụ cho đào tạo nghề thú y trình độ cao đẳng mà còn dùng để biên soạn các chương trình dạy nghề trình độ trung cấp, sơ cấp hoặc tổ chức các lớp tập huấn theo từng chuyên mục.

Vì thời gian có hạn, tuy đã có nhiều cố gắng nhưng không thể tránh khỏi những thiếu sót, rất mong được các bạn góp ý để giáo trình hoàn thiện hơn.

CHƯƠNG TRÌNH MÔ ĐUN

VI SINH VẬT HỌC THÚ Y

Tên mô đun: Vi sinh vật học thú y

Mã mô đun: MĐ 09

Thời gian mô đun: 60 giờ (Lý thuyết: 24 giờ ; Thực hành: 30 giờ; Kiểm tra: 6 giờ)

I. Vị trí, tính chất của mô đun

- Vị trí của mô đun: mô đun này là mô đun cơ sở chuyên ngành, được học xong môn giải phẫu
- Tính chất của mô đun: Mô tả vi khuẩn, virus gây bệnh, thực hiện việc nuôi cấy nhuộm mẫu của vi khuẩn, nấm.
- Ý nghĩa và vai trò của Mô Đun: là mô đun cơ sở cung cấp kiến thức cơ bản về cấu trúc, hình thái, các cách chẩn đoán và phòng trị các loại vi sinh vật thường gây bệnh trên thú, đồng thời tạo cơ sở để học các môn chuyên ngành sau này.

II. Mục tiêu của mô đun

- Mô tả được các đặc tính: sinh vật học, tính gây bệnh của mầm bệnh để áp dụng trong chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm
- Nuôi cấy, nhuộm mẫu, soi và nhận dạng được một số vi khuẩn, nấm gây bệnh cho vật nuôi
- Cẩn thận trong từng thao tác, nghiêm túc trong suốt quá trình thực hiện.

III. Nội dung mô đun

1. Nội dung tổng quát và phân phối thời gian:

TT	Tên các bài trong mô đun	Thời gian			
		Tổng số	LT	TH/TL/TN/BT	K.tra
1	Bài 1: Các virus gây bệnh thường gặp	14	6	6	2
2	Bài 2: Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp	30	14	14	2
3	Bài 3: Các nấm gây bệnh thường gặp	16	4	10	2
Tổng cộng		60	24	30	6

BÀI 1

CÁC LOẠI VIRUS GÂY BỆNH THƯỜNG GẶP

MỤC TIÊU

- Mô tả được các đặc tính sinh vật học và tính gây bệnh của một số loại virus
- Thực hiện được một số phương pháp cơ bản trong chẩn đoán sự có mặt của virus gây bệnh theo đúng qui trình hướng dẫn
- Cẩn thận, tỉ mỉ trong các thao tác trong từng phương pháp chẩn đoán

1. Virus gây bệnh dịch tả cho lợn (*CSF – Classical Swine fever virus*)

1.1. Đặc tính sinh vật học:

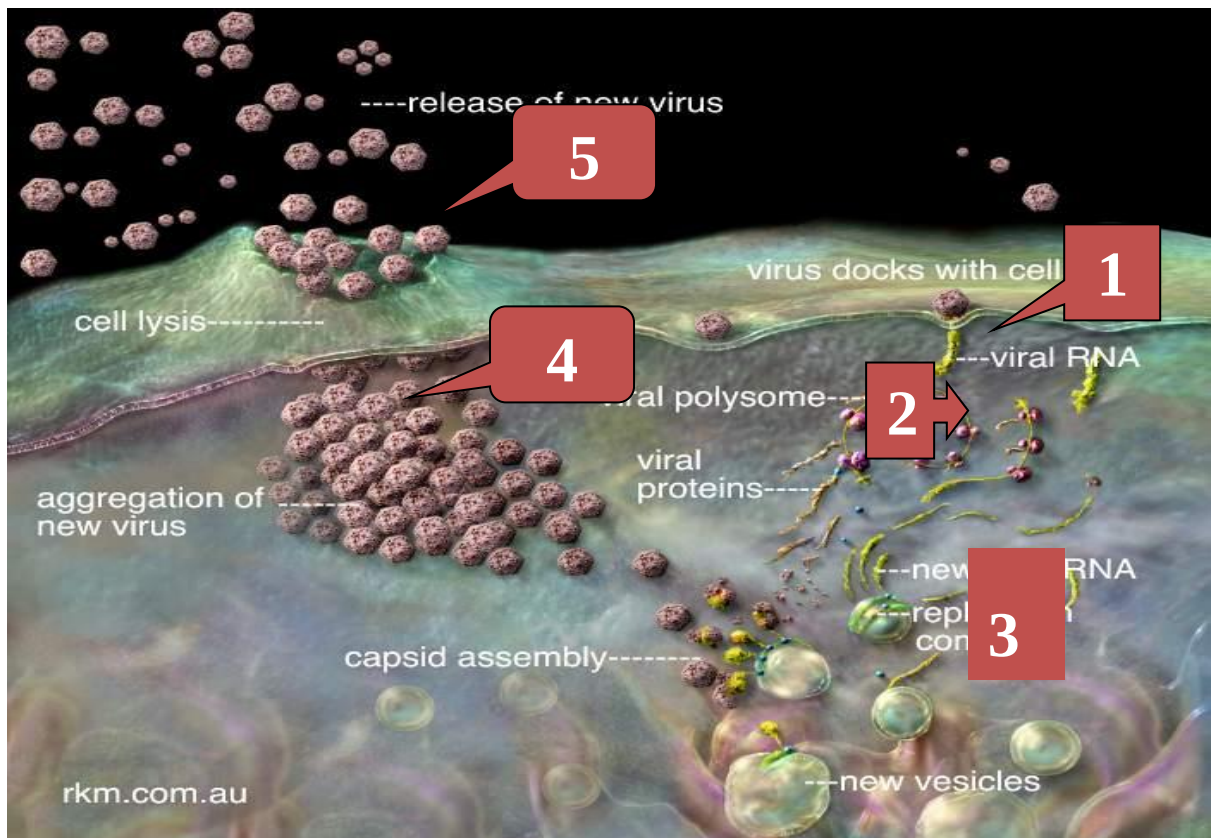
Virus thuộc họ FLAVIVIRIDAE có hình cầu có áo ngoài đường kính 40-60nm, có vỏ nucleocapsid đường kính 25 - 30 nm bao bọc

Bộ gene (genome): là virus ARN 1 sợi có kích thước 10,6 -10,9kb . Protein: trong cấu trúc có 3 loại glycoprotein ((gp 44/88; gp 33; gp 55~ E0; E 1; E 2 (Envelope) và có 4 protein không cấu trúc là p125 (p 54, p80) ; p 10; p30; p133 (p58, p75)

Đây là loại virus phát triển tốt/ tế bào sơ cấp, Nhân lên trong tế bào chất (tế bào pk 15; sk 6; dịch hoàn heo): không gây bệnh tích. Chúng chỉ có một chủng nhưng độc lực thay đổi và nhiễm sang tế bào khác bằng cấu nối nguyên sinh chất hoặc phân chia tế bào. Sau đó, chúng giải phóng ra khỏi tế bào khoảng 5-6 giờ sau nhiễm.

Các bước xâm nhập của virus như sau:

1. Virus bám vào màng tế bào của ký chủ
2. Phóng thích RNA vào trong tế bào
3. Tổng hợp RNA và protein của virus mới
4. Kết hợp thành virus hòa chỉnh
5. Virus thoát khỏi tế bào



Đề kháng yếu (chất sát trùng), Virus trong dịch tế bào (60°C / 10 phút), bền pH 5-10, khi làm thịt xông khói có thể tồn tại 168 ngày, trong phân (10tuần/ $4-17^{\circ}\text{C}$), thịt đông lạnh (27ngày)và tại ủ xương (73 ngày).

1.2. Chẩn đoán virus:

Để chẩn đoán bệnh này người ta có thể gây bệnh thí nghiệm trên lợn choai rồi quan sát triệu chứng lâm sàng và mổ khám kiểm tra bệnh tích điển hình (phương pháp sinh học) : Bệnh dịch tả heo mọi lứa tuổi (sốt, xuất huyết da cơ quan., tiêu chảy, sảy thai (nái), bại liệt nửa thân sau, xuất huyết từ hạch lympho, lách và niêm mạc, sung - xuất huyết toàn thân (ban tím lấm tẩm dạng đầu đinh ghim)

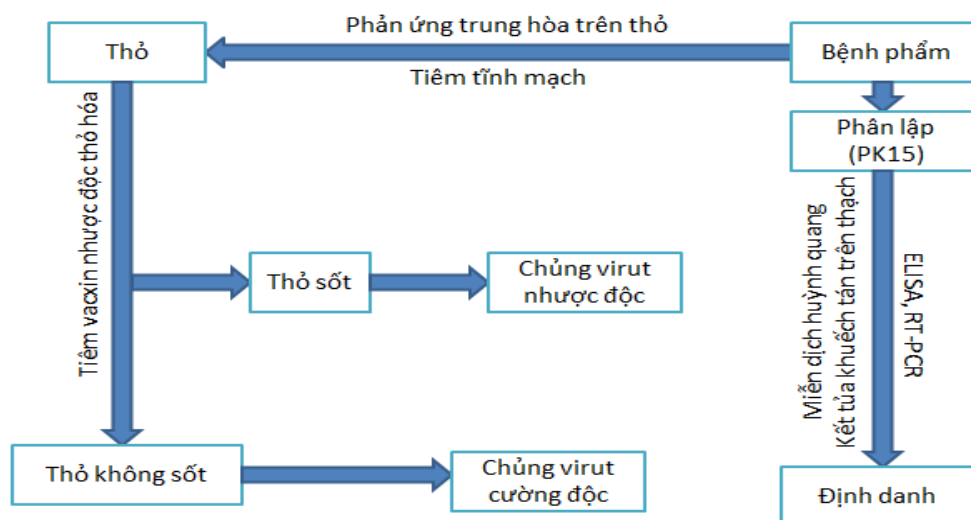




1.3. Chẩn đoán huyết thanh học

Bao gồm : phản ứng trung hòa trên thỏ, phản ứng kết tủa khuếch tán trong thạch, các phản ứng miễn dịch kháng thể đánh dấu như kháng thể đánh dấu huỳnh quang, Elisa (xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme – khi phát hiện kháng thể), RT-PCR (phản ứng khuếch đại DNA – khi phát hiện 1 đoạn gene của virus)

Sơ đồ chẩn đoán Virut dịch tả heo (Flaviviridae)



Ngoài ra có thể sử dụng phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp (IHA): Virus dịch tả lợn tuy không gây ngưng kết cũng như không hấp phụ lên bề mặt hồng cầu nhưng nếu hồng cầu được xử lý bằng acid tannic thì acid này một mặt (có nhóm chức) gắn lên hồng cầu còn mặt khác gắn với protein khác, kể cả virus dịch tả lợn. Như vậy, tổ hợp hồng cầu gắn virus trở thành kháng nguyên virus hữu hình và tham gia vào phản ứng ngưng kết như các kháng nguyên hữu hình khác.

Xử lý hồng cầu: Máu lấy từ tĩnh mạch được trộn đều với dung dịch đệm Alsever (2,5g dextrose, 8 g citrate natri, 0,55 g acid citric, 4,2 g NaCl, nước cất q.s. 100 ml, pH 6,1). Đầu tiên rửa hồng cầu ba lần bằng dịch muối sinh lý đệm phosphate (PBS) 0,15 M, pH7 và ly tâm tốc độ thấp (1.500v/ph), lần cuối cùng

gạn bỏ bớt nước trong ở trên rồi pha vào PBS pH 7,2 để tạo hỗn dịch hồng cầu 50%. Tiếp theo làm ổn định bề mặt hồng cầu bằng cách thêm vào hỗn dịch hồng cầu formalin 37 - 40% đã pha loãng tương đương với PBS pH 7,2. Đậy nắp ống nghiệm và lắc nhẹ, để ở nhiệt độ phòng 2 giờ có lắc nhẹ thường xuyên. Rửa lại ba lần bằng PBS (hồng cầu đã xử lý như vậy có thể giữ được 4 tháng ở 4 °C).

Tannin hóa (xử lý bằng tannin): pha huyền dịch hồng cầu 3% với một lượng tương đương dung dịch acid tannic 1:20.000. Sau 10 - 15 phút, hồng cầu lại được rửa 2 - 3 lần bằng PBS pH 7,2 rồi pha thành huyền dịch 50% trong PBS pH 6,4, chú ý rằng sau khi tannin hóa hồng cầu không được tiếp xúc với protein. Trộn huyền dịch 50% hồng cầu đã tannin hóa với lượng tương đương dịch virus (có thể dùng vaccine dịch tả lợn hoặc lừa cấy virus dịch tả lợn để phát hiện kháng thể, hoặc hạch, lách và nội quan khác của lợn nghi mắc bệnh nghiến với nước sinh lý nếu để phát hiện kháng nguyên), để ở 37°C trong 60 phút rồi rửa 2 - 3 lần lại bằng PBS pH 7,2 và pha trong PBS pH 7,2 có 1% huyết thanh thử bình thường thành dịch 1% hồng cầu ta có kháng nguyên ngưng kết hồng cầu gián tiếp. Ngoài formalin, hồng cầu còn có thể xử lý bằng glutaraldehyde hoặc acrolein. Nếu dùng để phát hiện kháng thể trong máu động vật nhất thiết phải kiểm tra lại kháng nguyên IHI bằng huyết thanh dương tính chiết từ máu lợn tối miễn dịch.

Huyết thanh đối chứng âm tính là huyết thanh lợn khỏe mạnh, huyết thanh đối chứng dương tính chiết từ máu lợn đã được tối miễn dịch kháng virus dịch tả lợn. Huyết thanh nghi ngờ lấy từ máu lợn có thể để nguyên hoặc pha 1:5.

Phản ứng có thể tiến hành trên dây ống nghiệm nhưng dùng khay nhựa vi chuẩn độ (microtiter) 96 lỗ đáy V hoặc U thuận lợi và tiết kiệm hơn nên rất được ưa dùng. Để phát hiện kháng thể kháng virus dịch tả lợn trong máu lợn, trước hết pha huyết thanh nghi trong dung dịch muối sinh lý 0,8% NaCl (pH 7,2) theo cấp số 2

bằng cách cho sẵn vào các lỗ 1 đến 12 của một dãy một lượng không đổi 50 µl nước sinh lý rồi cho vào lỗ thứ nhất 50 µl huyết thanh, trộn đều bằng cách hút nhả 3 - 4 lần rồi hút 50 µl sang lỗ thứ 2, trộn đều rồi lại hút 50 µl từ lỗ thứ 2 sang lỗ thứ 3, cứ thế tiếp tục đến hết lỗ thứ 11 thì hút bỏ 50 µl (vào dịch sát trùng). Thêm 50 µl nước sinh lý vào lỗ thứ 12 để làm đối chứng âm tính huyết thanh. Thêm vào tất cả các lỗ 50 µl kháng nguyên IHA 1% (luôn khuấy cho đều) trừ lỗ thứ 11 làm đối chứng âm tính kháng nguyên bằng cách cho vào 50 µl huyền dịch hồng cầu formalin hóa 1%. Đây

nắp kín, để ở nhiệt độ phòng 3 - 5 giờ thì đọc kết quả dựa vào kết quả ở hai lỗ âm tính, khi hồng cầu ở hai lỗ này đã đọng xuống tâm đáy lỗ khay hoàn toàn mà nếu nghiêng khay ta sẽ thấy chúng chảy (do trọng lực) thành dòng rõ rệt. Trong phản ứng dương tính, do mối liên kết đa chiều qua cầu nối kháng thể, các hồng cầu không lắng đọng ở tâm đáy mà rải đều khắp mặt đáy lỗ.

Để phát hiện kháng nguyên, ta pha dãy huyết thanh dương tính từ lợn đã tối miễn dịch từ nồng độ 1:10 đến 1:1.280 rồi cho kết hợp với kháng nguyên nghi ngờ đã hấp phụ như hồng cầu nêu ở trên. Bên cạnh phản ứng chính cần thiết lập phản ứng đối chứng huyết thanh âm tính và đối chứng hồng cầu dương tính. Kết quả phản ứng như mô tả ở trên. Bên cạnh đó, có thể áp dụng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gián tiếp. Cho bệnh phẩm vào kháng huyết thanh dịch tả lợn có hiệu giá đã biết và trộn cho tế bào vỡ và kháng nguyên tiếp xúc được với kháng thể. nếu có kháng nguyên thì hiệu giá kháng thể trong kháng huyết thanh chuẩn sẽ sụt giảm.

1.3. Phòng trị

Heo nái được tiêm phòng – kháng thể qua sữa đầu (36-48 giờ đầu) bảo hộ 5 tuần đầu (không ngăn virus nhân lên, thải ra ngoài). Đồng thời kháng thể thụ động bảo hộ 80% heo (21 ngày) và 50% (42 ngày), tiến hành tiêm phòng cho heo con vào tuần thứ 6. Thời gian bán hủy kháng thể mẹ truyền là 14 ngày.

Heo con nhiễm virus từ lúc bào thai (45 ngày đầu, cuối thai kỳ): heo con bệnh sau khi sinh .

Trong 1 số trường hợp gây ra hiện tượng dung nạp miễn dịch không kháng thể, không tạo miễn dịch sau khi tiêm vaccin

Chuồng trại chăn nuôi cần được vệ sinh, tiêu độc khử trùng 1 lần 1 tuần, nếu trong thời gian xuất hiện bệnh dịch trong địa phương cần tiêu độc khử trùng 2 đến 3 lần 1 tuần.

2. Virus gây bệnh viêm gan ở vịt, ngan (VGV - *Hepatitis anatum virus* – Duck *Hepatitis Virus*)

Thể I và III: Enterovirus thuộc nhóm Picornavirus ; thể II: astrovirus; viêm gan B : Avihepadnavirus của họ Hepadnaviridae. Tuy nhiên chúng ta chỉ quan tâm đến chủng thường gặp trên vịt là I và III gây bệnh ở vịt < 6 tuần tuổi và nặng ở 1-3 tuần tuổi

2.1. Đặc tính sinh vật học

Do virus *Enterovirus* thuộc nhóm *Picornavirus*. Đây là virus nhỏ không có vỏ bọc, bề mặt xù xì, kích thước nhỏ đối xứng khối 20 mặt đều, đường kính 22 - 30 nm. Không có khả năng gây ngưng kết hồng cầu.

Capsid có mặt ngoài nhẵn, tròn, lõi gồm RNA một sợi dương, đuôi thẳng, dài 7,5 - 8,5 kb, và protein VPg liên kết với RNA. Capsid các *Picornavirus* cấu thành từ 60 tiểu đơn vị protein (protomer) có thành phần từ 4 loại protein cấu trúc virus (VP1, VP2, VP3 và VP4).

Không có miễn dịch chéo với virus viêm gan ở người và virus gây dịch tả vịt

Quá trình nhân lên: Virus kết bám lên thụ thể trên bề mặt tế bào. Từ màng tế bào chất, RNA sợi dương rời khỏi nucleocapsid rồi di hành vào tế bào chất. Từ sợi RNA dương này hình thành sợi cRNA có độ dài gene phục vụ như khuôn để tái tạo RNA virus. Mặt khác từ RNA virus vốn có số lượng lớn cistron tổng hợp 1 loại phân tử protein đơn nhất không lồ (phân tử lượng 240 - 250 kDa) có hoạt tính enzyme phân giải protein. Từ protein tiền chất này bị cắt từ từ dưới tác dụng của enzyme phân giải protein, hình thành các phân tử protein có phân tử lượng nhỏ. Trước tiên, protein tiền chất tạo ra thể ngũ trọng gồm 5 phân tử protein tiền chất. Từ các sợi khác nhau trong số 5 phân tử tiền chất này các protein VP0, VP1 và VP3 bị cắt bớt, sau đó 12 thể ngũ trọng như vậy tập hợp lại tạo thành một tiền capsid (procapsid) rỗng. Sự tái tạo RNA virus diễn ra trong tế bào chất. Sau khi được tổng hợp, RNA virus di hành vào và kết hợp với procapsid, trở thành provirion (tiền virion). Ở giai đoạn này, VP0 phân cắt thành VP2 và VP4, kết cục, virion có cấu tạo từ 60 phân tử mỗi loại hình thành các protein VP1, VP2, VP3 và VP4, virus thoát ra khỏi tế bào mà thành thực.

Virus viêm gan có sức đề kháng tương đối cao đối với nhiệt độ (37°C , virus có thể tồn tại 48h, 60°C trong 30 phút virus vẫn chưa bị giết và vào mùa đông nhiệt độ thấp virus càng tồn tại được lâu hơn) và hóa chất (tồn tại trong dung dịch formon 0,01% ở 37°C trong 8h và 1% và phải mất 3h mới diệt được). Trong rơm độn chuồng, thức ăn, nước uống, virus có thể tồn tại từ 15-40 ngày.

2.2 Chẩn đoán virus học:

Nuôi cấy virus; lấy gan vịt bệnh nghiền nát với dung dịch đệm (PBS) tỉ lệ 1/5, xử lý kháng sinh (ly tâm lấy nước trong và xử lý với cloroform 5% trong 10 phút

Trên phôi vịt 10 -14 ngày, tiêm xoang niệu, sau 18-72h phôi chết. Với các bệnh tích điển hình: phôi xuất huyết nặng dưới da đầu và tứ chi, gan sưng, có nhiều điểm xuất huyết, trên bờ ật gan có nhiều điểm hoại tử màu vàng. Nếu phôi chết muộn nước trứng chuyển sang màu xanh nhạt.



phôi vịt chết ở 15 ngày tuổi do nhiễm virus

Trên phôi gà: 9-10 ngày tuổi, tiêm xoang niệu mô, sau khi tiêm 5-6 ngày phôi chết. Với các bệnh tích trên da: phôi còi cọc.

Trên môi trường tế bào: tế bào xơ phôi gà, phôi vịt, thận phôi vịt, thận phôi gà. Sau 2-4 ngày gây nhiễm tế bào bị hủy hoại: màng tế bào bị vỡ, nguyên sinh chất bị mất chỉ còn nhân.

Hoặc gây bệnh trên vịt con và chăn chẩn đoán các triệu chứng và bệnh tích điển hình : Hình thái đầu ngoẹo ra sau, chân duỗi thẳng lúc chết thường được coi là triệu chứng đặc trưng của bệnh viêm gan vịt

Toàn mặt gan có nhiều nốt xuất huyết bằng đầu đinh ghim, màu đỏ, rìa gọn. Đôi khi các nốt này nhỏ li ti và tràn lan



Chẩn đoán phân biệt bệnh Viêm gan vịt với các bệnh sau:

a. *Phó thương hàn vịt*: Có thể chữa khỏi bằng kháng huyết thanh, hoặc kháng sinh. Trái lại bệnh viêm gan vịt thì không có kết quả, thậm trí có thể chết nhiều hơn .

b. *Bệnh dịch tả vịt*: Hiện tượng xuất huyết không chỉ thấy ở gan mà còn ở các tổ chức khác: da, bao tim, màng ngực, niêm mạc dạ dày và ruột...ngoài ra virus dịch tả vịt còn gây bệnh cho vịt ở mọi lứa tuổi.

c. *Bệnh ngộ độc do Aflatoxin*: Có triệu chứng gần giống viêm gan do virus nhưng kiểm tra tổ chức gan thấy tế bào gan bị phá hủy nghiêm trọng, ngoài ra bệnh ngộ độc nấm mốc không có hiện tượng sốt.

2.3 Chẩn đoán huyết thanh học Dùng với mục đích định tuyp virus, đánh giá mức độ nhiễm sau khi tiêm vaccine hoặc điều tra dịch tễ.

- Thường sử dụng phản ứng trung hòa (trên vịt con để định tuyp I):
- Thực hiện trên vịt 1-7 ngày tuổi, chia làm 2 lô:

Lô thí nghiệm: mỗi vịt tiêm 1-2ml huyết thanh chuẩn tuyp I sau 24h phân lập.

Lô đối chứng: chỉ tiêm virus phân lập được

Nếu kết quả: 80-100% vịt đối chứng chết, 80-100% vịt thí nghiệm sống thì virus gây bệnh thuộc tuyp I

2.4 Phòng trị

Thường xuyên làm tốt công tác vệ sinh, tiêu độc dụng cụ chăn nuôi, máng ăn, máng uống, chuồng trại và khu vực xung quanh. Tiêu độc, máy ấp, dụng cụ ấp, tiêu độc sát trùng trứng trước khi đưa vào ấp bằng vinadin: 100ml thuốc pha với 10 lít nước hoặc chlorine dioxide: 1g pha với 1 lít nước.

Không nhập vịt con từ vùng có bệnh lưu hành thường xuyên. Đảm bảo thức ăn, nước uống sạch sẽ, vịt được sống trong điều kiện tối ưu nhất

Thực hiện nghiêm lịch phòng bệnh bằng vacxin cho vịt.

Vaccine nhược độc: 0,2ml/con, tiêm dưới da, dùng cho vịt con <1 ngày tuổi (vịt mẹ không có miễn dịch); 7-10 ngày khi vịt mẹ có miễn dịch. Theo OIE (2000) tiêm vào 12 ngày – 8 – 4 tuần trước để tạo miễn dịch cho con.

Vaccine vô hoạt sử dụng 3 lần cho đàn vịt sẽ tạo miễn dịch cho vịt con. Hiện tại đang nghiên cứu và sản xuất thử nghiệm vaccine chủng nhược độc DH-EG-2000 trên phôi gà 9-10 ngày tuổi.

Bồi bổ cơ thể, tăng cường sức đề kháng bằng một trong các sản phẩm như: B.complex, Vinamix 200, Stress-bran, Premix-vitamin-khoáng...

3. Virus gây bệnh dịch tả vịt (*Pestis Anatum, Duck Virus Enteritis*), còn gọi là bệnh viêm ruột siêu vi trùng vịt.

3.1. Đặc tính sinh vật học

Bệnh dịch tả vịt là một bệnh truyền nhiễm lây lan mạnh do *Herpesvirus* gây ra. Bên cạnh đó, vi rút này gây bệnh dịch tả đối với cả ngan, ngỗng, thiên nga...

Các virus thuộc họ Herpesviridae là những virus có cấu tạo khá phức tạp, thường có dạng hình cầu. Ở trung tâm có lõi (core) là phức hợp thể protein và DNA cuộn xoắn dạng cuộn chỉ, được bao bọc bởi áo ngoài (envelope) là lớp màng tế bào ký chủ đã biến hóa, thâm nhập trong lớp kép lipid này có các glycoprotein đặc hiệu virus. Virion có đường kính 136 - 250 nm. Trên bề mặt áo ngoài có các cấu trúc lõi hay peplome (gai). Trên áo ngoài có các glycoprotein gây cảm ứng cơ thể hình thành kháng thể trung hòa và thụ thể dành cho vùng Fc của IgG.

Cấu tạo bộ gene là một phân tử DNA hai sợi đuôi thẳng. Trong trình tự tự nucleotide của nó có chứa các đoạn trật tự lặp. Phụ thuộc vào vị trí các đoạn trật tự lặp và hướng trật tự giống nhau hay khác nhau (trật tự lặp đảo vị) mà các virus họ này được chia thành 6 nhóm, A, B, C, D, E và F.

Protein vỏ đến nay đã thấy hơn 20 loại protein cấu trúc của virus. Virus chỉ có 1 serotyp nhưng lại có nhiều loại biến chủng độc lực khác nhau

Quá trình nhân lên: Virus thông qua các glycoprotein có nhiều trên bề mặt áo ngoài (envelope) mà kết bám trên tế bào ký chủ. Tiếp đó áo ngoài dung hợp với màng tế bào và phóng xuất nucleocapsid vào trong tế bào. Nucleocapsid di động đến lỗ trên màng nhân tế bào và bơm acid nucleic vào trong nhân. Ở đó các mRNA (RNA thông tin) đặc hiệu của virus được tổng hợp, từ đầu đến cuối đều nhờ RNA-polymerase phụ thuộc DNA của tế bào ký chủ. Sau khi tổng hợp được một loạt mRNA, trên các ribosome trong tế bào bắt đầu tổng hợp các protein nhóm α . Các protein này lại di hành vào nhân. Dưới tác động ức chế của các protein này, các mRNA mới được tổng hợp và được chuyển ra ribosome để tổng hợp các protein nhóm β . Đại bộ phận protein β trong đó có DNA-polymerase di hành trở lại vào nhân, bắt đầu sao chép DNA virus. Tiếp đó, dưới sự chế ngự của protein nhóm β , các mRNA mới lại được tổng hợp, từ đó các protein cấu trúc chủ yếu của virus (các protein nhóm γ , đa số là các capsomer) được tổng hợp. Các DNA virus

được di nhập vào trong các capsid đang hình thành từ các protein capsomer, mà hình thành nucleocapsid. Khi nảy chồi (budding: "xuất nha") ra khỏi tế bào.

Các herpesvirus đã cảm nhiễm cơ thể dù phát bệnh hay không đều tồn tại suốt cả đời ký chủ ở trạng thái genome trong khí quan hoặc tổ chức đặc hiệu. Điều này thường được gọi là cảm nhiễm ần tính. Các virus cảm nhiễm ần tính được tái hoạt hóa khi cơ thể ký chủ bị stress, sức đề kháng giảm sút, và bài xuất ra ngoài tiếp tục lây nhiễm ký chủ mới. Các cơ chế hình thành, duy trì và tái hoạt hóa của cảm nhiễm ần tính còn nhiều điểm chưa được rõ.

Virus nhạy cảm với ether, cloroform, còn 75^0 , virus bất hoạt khi $PH < 3$ và $PH > 10$. Nó có sức đề kháng kém với sức nóng $30^0/2h$, $70^0/20$ phút, $80^0/5$ phút.

3.2 Chẩn đoán virus

Chẩn đoán dựa theo đặc điểm triệu chứng bệnh tích

Nuôi cấy : bệnh phẩm trên gan, óc, lách của vịt bệnh sau đó xử lý tương tự như bệnh viêm gan ở vịt

Trên phôi vịt: dùng phôi vịt 12 ngày tuổi, tiêm xoang niệu mô, màng nhung niệu. sau 4-10 ngày phôi chết với bệnh tích: xuất huyết đặc hiệu trên da đầu lưng, rìa cánh, gan xuất huyết và hoại tử.

Trên phôi gà: virus ít mẫn cảm, nếu cấy truyền tiếp 12 đời virus trên phôi gà, virus thích nghi. Từ đời truyền từ 3 phôi gà chết sau 4-5 ngày khi tiêm vào và chết sau 4-5 ngày khi tiêm vào và chết sau 7 ngày khi tiêm vào màng nhung niệu.

Trên tế bào: virus nhân lên tế bào xơ phôi vịt, gan, gan phôi gà. Sau 2-4 ngày, virus gây hủy hoại tế bào: tế bào co tròn, biến dạng

Trên động vật cảm nhiễm: dùng vịt con 1 ngày tuổi, 3-12 ngày sau vịt chết với triệu chứng điển hình của bệnh

3.3 Chẩn đoán huyết thanh học

Phản ứng trung hòa: chỉ số trung hòa $> 1,75$ (nếu VN index từ 0-1,5 -> không kết luận con vật bệnh).

Dùng phản ứng Elisa tiềm kháng thể và dùng phản ứng huỳnh quang tiềm kháng nguyên và PCR tìm đoạn gen

3.4 Phòng trị

Vaccine nhược độc DTV đông khô qua phôi vịt, pha tỉ lệ 1/200. Vịt con (0,2ml), vịt lớn (0,5ml). Tiêm dưới da miễn dịch 1 năm nhưng không khống chế bệnh lây qua trứng

Vaccine nhược độc DTV chủng Jansen, chế qua phôi gà. Tiêm cho vịt 1-2 tuần tuổi, vịt đẻ (tiêm lặp lại hàng năm) tỉ lệ miễn dịch 70% dùng can thiệp vào ổ dịch đạt hiệu quả cao

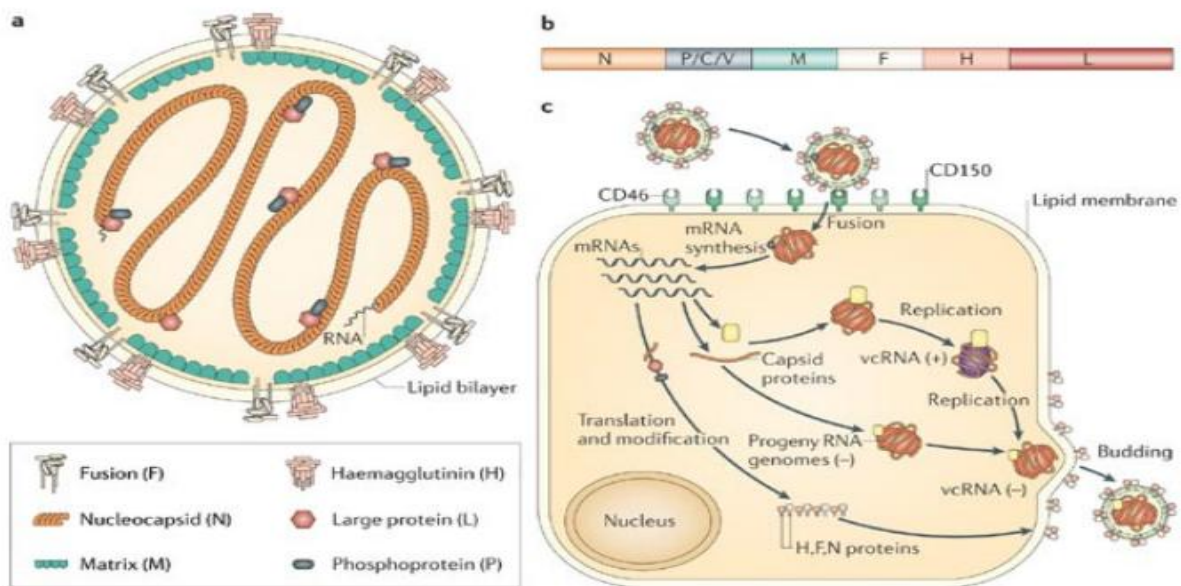
4. Virus gây bệnh Newcastle (dịch tả gà, bệnh gà rù)

Bộ Mononegavirales, *Paramyxoviridae*: *Paramyxovirinae* (*Paramyxovirus*, *Rubulavirus*, *Morbilivirus*) và *Pneumovirinae* (*Metapneumovirus*)

4.1 Đặc điểm sinh vật học

Virion có đường kính 180 nm, hơi to hơn các orthomyxovirus chút ít, thường có dạng hình cầu hoặc đa hình thái. Vỏ ngoài trên bề mặt có 2 loại gai (spike) glycoprotein sắp xếp chặt chẽ. Do không bền vững, khi bị làm đông giá và tan giá hay khi được tinh chế vỏ ngoài thường rất bị phá hủy dễ dàng, nên dưới kính hiển vi điện tử thường thấy nucleocapsid được lộ xuất ra ngoài. Nucleocapsid đối xứng xoắn dạng sợi thừng có chiều rộng 14 - 18 nm, chiều dài khoảng 1 μ m. Virion miễn cảm với ether, formalin, các chất hoạt tính bề mặt, nhiệt hoặc khô.

Gene virus là RNA 1 sợi âm. Nhân lên trong tế bào chất và hình thành thể vùi ở nhân và tế bào chất. Gây ngưng kết hồng cầu : gà, gà tây, vịt ngỗng.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Paramyxovirus nếu kết hợp với thụ thể có chứa acid sialic thì nhờ hoạt tính dung hợp màng của protein F mà gây dung hợp vỏ ngoài với màng tế bào, đưa nucleocapsid vào bên trong tế bào. Trong nucleocapsid đã có sẵn enzyme RNA-polymerase phụ thuộc RNA, dưới tác dụng của enzyme này trên khuôn RNA virus diễn ra sự tổng hợp các mRNA đơn cistron (mRNA phiên chỉ một gene cấu trúc) dài ngắn khác nhau. Trên polysome các mRNA đó tham gia tổng các loại protein của virus. Đồng thời với quá trình đó, từ RNA virus diễn ra quá trình tổng hợp hoàn toàn hình thành chuỗi RNA dương. Một mặt, các glycoprotein vừa được tổng hợp được chuyển từ mạng lưới nội chất hạt (thể tiêu bào hạt) sang mạng lưới nội chất nhẵn, rồi bộ máy Golgi và đến màng tế bào chất mà tổ hợp vào trong màng tế bào chất. Protein M được tổng hợp tương tự cũng di động ra dưới màng tế bào chất và cố định các glycoprotein ở màng, nucleocapsid di động đến dưới protein M, nhận áo ngoài nhờ nảy chồi qua màng đã biến đổi sẵn nêu trên mà trở nên thành thực. Tuy nhiên, thông thường hầu hết nucleocapsid ở lại bên trong tế bào chất ký chủ và được quan sát thấy dưới dạng các thể ẩn nhập trong tế bào chất. Trong cảm nhiễm paramyxovirus, ngoài sự khuếch đại cảm nhiễm theo cách nảy chồi qua màng nêu trên còn đồng thời diễn ra hình thành thức lan truyền từ tế bào qua tế bào (cell-to-cell infection). Khi đó, nhờ cơ năng dung hợp màng của protein F xuất hiện ở bề mặt tế bào mà RNA virus lưu nhập từ tế bào đã cảm nhiễm sang các tế bào lân cận. Vì vậy hình thành các tế bào khổng lồ đặc trưng. Đồng thời, cảm nhiễm kéo dài cũng là đặc trưng khác của các virus thuộc họ này.

Đề kháng yếu với chất sát trùng, chịu biến đổi khi pH 2-12 nhưng tồn tại lâu ở -70°C.

Đây là virus hướng nội tạng, hướng phổi và hướng thần kinh. Đồng thời có 2 dòng độc lực khác nhau: cao (Velogenic) và vừa (Mesogenic)



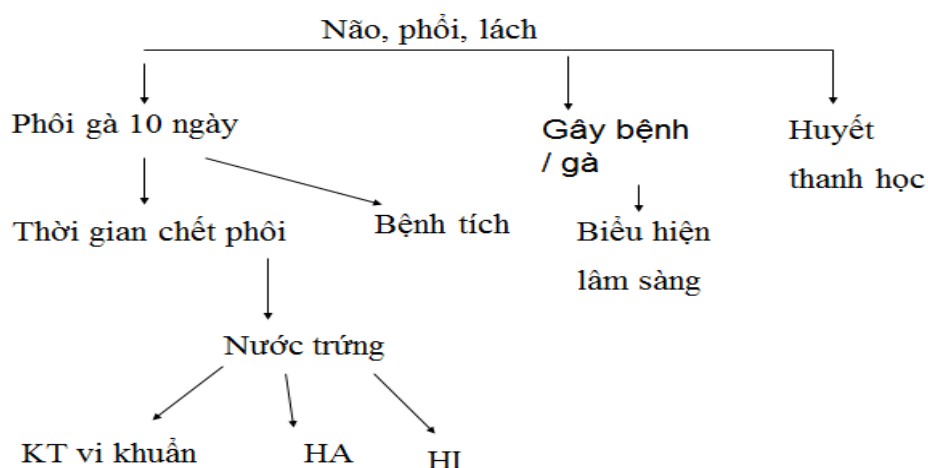
4.2 Chẩn đoán virus học

Người ta có thể áp dụng phản ứng bảo vệ trên gà thí nghiệm, phản ứng trung hòa trên gà, phôi gà và lứa cấy tế bào.

Nuôi cấy : Các virus Newcastle có khả năng và thời gian gây chết phôi gà rất khác nhau. Khi có virus Newcastle vào xoang niệu mô của phôi gà ấp từ 9-11 ngày, tùy theo độc lực của từng chủng mà có thể làm chết phôi từ 48 -100h. Hiệu giá virus cũng thay đổi theo chủng virus và những chủng gây chết phôi chậm hoặc không gây chết phôi sẽ cho hiệu giá cao nhất (Gough và ctv, 1974) [115]. Đường tiêm cũng rất quan trọng, khi tiêm vào túi lòng đỏ thường gây chết phôi nhanh hơn khi tiêm virus Newcastle vào túi niệu (Estupinan và ctv, 1968; Beard và Hanson, 1984).

Ngoài ra có thể nuôi cấy trên tế bào xơ phôi gà: gây bệnh tích màng tế bào (plaque)

Phân lập virus theo sơ đồ



4.3. Chẩn đoán huyết thanh học (HI và ELISA)

HI: phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu là phản ứng thường được sử dụng để xác định kháng thể kháng virus bệnh Newcastle trong huyết thanh gà. Phản ứng của virus gây ngưng kết hồng cầu gà không phải là phản ứng huyết thanh học mà là đặc tính sinh học của virus. Phản ứng này bị mất một cách đặc hiệu nếu virus được trộn trước với kháng huyết thanh tương ứng, nên có thể lợi dụng tính chất ngưng kết và mất ngưng kết để chuẩn độ kháng thể.

Phản ứng có thể tiến hành trong dây ống nghiệm nhưng sử dụng khay polyethylene 96 lỗ đáy U hoặc V vì tiện lợi, tiết kiệm và dễ đọc kết quả phản ứng hơn

nhiều. Trước hết ta phải thiết lập phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA: haemagglutination reaction) với huyền dịch hồng cầu làm việc (1% hoặc 0,5%) để xác định nồng độ huyền dịch virus làm việc. Huyền dịch hồng cầu gà được chế từ máu gà đã chống đông bằng citrate natri, heparin, EDTA hoặc dung dịch Alsever (xem phần "Virus dịch tả lợn"), rửa 3 lần bằng nước sinh lý muối hoặc PBS pH 7,2 kết hợp ly tâm 1.500 - 2000 vòng/phút trong 10 phút, vớt bỏ nước trong ở trên rồi thêm vào 1 phần cạn hồng cầu (tươi) 99 phần (hoặc 199) PBS để có huyền dịch hồng cầu 1% (hoặc 0,5%). Kháng nguyên có thể là vaccine virus Newcastle đã biết hoặc dịch trứng đã tiêm nhiễm virus Newcastle pha loãng nhất định (1/2 hoặc 1/10). Để thiết lập phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA), trước hết ta cho vào tất cả các lỗ khay của 1 dãy gồm 12 lỗ một lượng 50 µl rồi cho vào lỗ thứ nhất 50 µl dịch virus, trộn đều bằng cách hút - nhả 3 -

4 lần rồi hút 50 µl chuyển sang lỗ thứ hai. Sau khi trộn, ta hút chuyển 50 µl từ lỗ thứ hai sang lỗ thứ ba, cứ thế tiếp tục cho hết lỗ thứ 10 thì hút vớt bỏ 50 µl. Lỗ thứ 11 và 12 để làm đối chứng âm tính virus. Cho vào tất cả các lỗ 50 µl huyền dịch hồng cầu gà làm việc nêu trên. Trộn đều bằng máy lắc hoặc hút nhả từ lỗ 12 cho đến hết lỗ 1 (từ nồng độ virus thấp đến nồng độ virus cao), để yên ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả phản ứng sau 15 - 60 phút tùy thuộc vào kết quả lắng đọng hồng cầu hoàn toàn ở tâm lỗ đối chứng âm tính virus (các lỗ 11 và 12). Trong phản ứng dương tính hồng cầu do ngưng kết với nhau thành mạng nên không chìm vào tâm lỗ khay U hoặc V mà kết thành mạng rộng thường có vết rạn nứt lấm tấm nếu để lâu. Hiệu giá virus là độ pha loãng lớn nhất còn cho kết quả phản ứng dương tính. Dịch virus ở độ pha loãng này chứa 1 đơn vị ngưng kết (1 HA). Dịch virus làm việc thường dùng trong phản ứng ngăn trở ngưng kết (HI) có nồng độ 4 HAU, tức có độ pha loãng nhỏ hơn 4 lần, và cách hai lỗ về phía dương tính.

Trước khi làm phản ứng chính HI cần pha virus từ dịch gốc để có dịch virus 4 HA và kiểm tra lại nồng độ virus làm việc này bằng cách thiết lập lại phản ứng HA tương tự như trên nhưng chỉ trong 4 lỗ khay: lỗ thứ nhất 2 HA, lỗ thứ hai 1 HA (đều phải cho ngưng kết chắc chắn), lỗ thứ ba 1/2 HA và lỗ thứ tư 1/4 HA (đều không có ngưng kết). Nếu thấy phản ứng không như kết quả như mong muốn thì pha thêm dịch virus gốc (nếu thấy các lỗ thứ hai ít hoặc không ngưng kết) hoặc pha thêm nước sinh lý (nếu thấy lỗ thứ ba xuất hiện ngưng kết) và lập lại phản ứng kiểm tra dịch virus 4

HA đó. Trước hết cho vào tất cả các lỗ của một dãy 12 lỗ khay lượng bằng nhau 50 µl nước sinh lý rồi cho vào lỗ thứ nhất 50 µl huyết thanh nguyên. Trộn đều bằng cách hút - nhả 3 - 4 lần rồi hút chuyển 50 µl sang lỗ thứ hai, trộn đều rồi chuyển sang lỗ thứ ba và tiếp tục như vậy cho đến hết lỗ 11 thì vớt bỏ 50 µl. Lỗ thứ 12 không thêm virus dùng để làm đối chứng âm tính virus. Thêm 50 µl dịch virus 4 HAU vào tất cả các lỗ trừ lỗ 11 lại thêm 50 µl nước sinh để làm đối chứng âm tính huyết thanh (lỗ này thực chất giống lỗ thứ hai trong phản ứng thử nồng độ virus 4 HAU nêu ở trên), trộn đều rồi để ở nhiệt độ phòng 10 - 15 phút cho phản ứng kháng nguyên - kháng thể (nếu có) xảy ra. Thêm 50 µl huyền dịch hồng cầu làm việc (như trong phản ứng HA, chú ý khuấy thường xuyên) vào tất cả các lỗ. Để ở nhiệt độ phòng 15 - 60 phút. Đọc kết quả sau khi phản ứng âm tính virus ở lỗ 12 cho kết quả rõ ràng (hồng cầu đọng hết ở tâm đáy lỗ khay trong khi phản ứng ngưng kết rõ ràng ở lỗ 11). Thông thường, nếu gà chưa được tiếp chủng vaccine Newcastle thì hiệu giá kháng thể từ 8 (3log) trở lên được coi là đặc hiệu cảm nhiễm. Nhưng để chắc chắn cần kiểm tra kháng nguyên hoặc virus học.

4.4 Phòng bệnh

Chương trình dùng vaccin như sau:

- + Trên gà con: chủng vaccin LASOTA lúc 1 ngày tuổi, lặp lại lúc 12 và 28 ngày tuổi.

- + Trên gà giống: Giai đoạn hậu bị chủng vaccin lúc 8-10 tuần tuổi, giai đoạn 2 tuần trước khi đẻ trứng chủng vaccin IMOPEST.

- * Kết hợp sử dụng một trong các thuốc sau để tăng sức đề kháng, giúp gia cầm khỏe mạnh, chống stress,...

- Thường xuyên trộn các loại premix như: NOVAMIX 6 (gà con), NOVAMIX 7 (gà giống hậu bị) NOVAMIX 8 (gà thịt), NOVAMIX 9 (gà đẻ trứng), NOVAMIX 10 (gà giống): liều 2,5kg/tấn thức ăn, dùng liên tục trong thức ăn cho từng giai đoạn gà phát triển.

- Sử dụng một trong các sản phẩm sau cung cấp vitamin, chất dinh dưỡng như: · NOVA-C COMPLEX: 2g/kg thức ăn hoặc 1g/lít nước, trong 3 ngày, 2 tuần dùng một lần. · NOVA VITA PLUS: 1g/ 2lít nước uống hoặc 1g/kg thức ăn. Dùng thường xuyên trong thức ăn, nước uống. · NOVA-ADE.B COMPLEX: 2g/kg thức ăn, trộn cho ăn liên tục

- Vệ sinh thức ăn, nước uống, dọn dẹp chuồng trại sạch sẽ. Định kỳ sát trùng chuồng trại bằng một trong các sản phẩm sau của Công ty Anova như NOVACIDE, NOVADINE, NOVASEPT.

5. Virus gây bệnh Gumboro (IBD- *Infectious bursal disease virus*)

Virus thuộc họ Birnavi, giống Avibirnavirus

5.1 Đặc điểm sinh học

Acid nhân là RNA, 2 sợi, virus không có vỏ, 4 protein chính của virus là VP1 (90KD), VP2 (41KD), VP3 (32KD) và VP4 (28KD). Trong đó, VP2 và VP3 là protein chính của virus. Ngoài ra, VP1 : RNA – polymerase của virus, VP4 : protease của virus. Người ta mới biết 2 protein mới của virus là VP5 (21KD) và VPx nhưng chức năng chưa biết rõ. Có 2 serotype là 1 và 2, serotype 1 gây bệnh cho gà, có 6 chủng. Serotype 2 gây bệnh ẩn tính trên gà và gà tây.

Quá trình nhân lên: Virus phát triển trong tế bào chất nhưng hầu như không ức chế sự tổng hợp RNA và protein của tế bào ký chủ. RNA thông tin của virus được sao chép nhờ enzyme sao chép liên kết virion và được tiến hành từ một trong hai sợi của mỗi phân đoạn RNA genome sao chép thành các mRNA 2 sợi không có poly-A phía đuôi 3', và có độ dài bằng độ dài của RNA genome. Sự tổng hợp RNA virus và protein đạt đỉnh điểm sau khi virus cảm nhiễm 6 - 8 giờ. Trong quá trình virus thành thực, pre-VP2 chuyển hóa thành VP2.

Vào khoảng 3 - 6 tuần tuổi của gà, tủy huyết bình thường đạt kích thước lớn nhất nhưng trong thời kỳ này gà con cũng mắc bệnh kịch liệt nhất.

Sức đề kháng tương đối mạnh: Không bị vô hoạt bởi ether và chloroform. Ở 60⁰C vẫn duy trì sức gây bệnh trong 90 phút, ở 56⁰ C tồn tại được 5 giờ và virus không bị ảnh hưởng trong dung dịch phenol 0,5%/1 giờ/30⁰ C. Virus bị tiêu diệt bởi các phức hợp iodine, sau 10 phút trong chloramin 0,5% nhưng trong dung dịch formol 0,5% tồn tại được 6 giờ.

5.2 Chẩn đoán virus học

Bệnh phẩm thường được lấy là tủy Fabricius

Tiêm vào phôi gà 9 – 11 ngày (tiêm màng CAM) hay phôi 6 – 8 ngày tuổi (tiêm đường tủy lòng đỏ).

Đường tiêm xoang niệu mô (Allantois) cho liều EID₅₀ thấp hơn 1,5 – 2 log so với đường tiêm màng CAM.

Sau khi nuôi cấy 2 – 3 ngày phôi chết với biểu hiện sau : thủy thủng vùng bụng, da sung huyết, xuất huyết điểm ở lỗ chân lông, khớp chân, gan hoại tử, lách sưng

Hoặc nuôi cấy trên môi trường tế bào sợi phôi gà (CEF), thận phôi gà (CEK),... tạo bệnh tích tế bào đặc hiệu (CPE) sau 48 – 96 giờ, tạo plaques, thâm tế bào trở nên lỏng lẻo, tế bào co tròn, tách khỏi thành chai, treo lơ lửng trong môi trường.

5.3 Chẩn đoán huyết thanh học

Các phương pháp huyết thanh học như phản ứng trung hòa virus, phản ứng kết tủa khuếch tán trong thạch và các phản ứng kháng thể (miễn dịch) đánh dấu enzyme, huỳnh quang, phóng xạ và ferritin.

Tìm kháng nguyên : Phản ứng miễn dịch huỳnh quang , phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch, phản ứng trung hòa

Tìm kháng thể: phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch, phản ứng ELISA

Phản ứng kết tủa khuếch tán trong thạch (AGP: agar gel precipitation reaction) là phản ứng huyết thanh học sử dụng được đối với hầu như tất cả các đối tượng vi sinh vật. Đây là phương pháp này khá đơn giản, từ một phản ứng có thể thu nhận được nhiều thông tin cùng lúc về tính phản ứng, tính thuần khiết của kháng nguyên và kháng thể,... Tuy nhiên phản ứng có độ nhạy thấp, đòi hỏi có đối chứng dương tính và đôi khi, do nồng độ của các thành phần phản ứng không thích hợp, phản ứng có thể xảy ra ngay mép lỗ thạch chứa kháng nguyên hay kháng thể nên rất khó phát hiện, đòi hỏi phải lặp lại phản ứng với nồng độ kháng nguyên hay kháng thể thay đổi. Để chế gel người ta hòa 1 g agarose (bột agar tinh chế) vào 100 ml nước sinh lý (dung dịch NaCl 8,5% đối với gia cầm, 8% đối với thú), đun cho tan đều rồi hấp cao áp (hoặc 2 phút sôi trong lò vi sóng) cho tan đều (đồng thời tiệt trùng), thêm 0,1% phenol hoặc 0,01% merthiolate để ngăn chặn nhiễm khuẩn, đảm bảo ổn định ở 50 °C, dùng ống hút (pipet) rót lên mặt phiến kính đã được đặt trên mặt phẳng một lượng thạch vừa phải sao cho thạch không trào ra khỏi rìa của phiến kính. (Có thể dùng đĩa petri đáy phẳng thay cho phiến kính nhưng có nhược điểm cồng kềnh). Để cho thạch rắn, đục một vài cụm lỗ thạch (dùng khuôn chuyên dụng hoặc ống đục lỗ làm từ một đoạn ống Anten tròn đã mài sắc mép, với khoảng cách và đường kính lỗ định trước khoảng 3 - 4 mm), mỗi cụm 7 lỗ: một lỗ giữa và 6 lỗ xung quanh. Khoảng cách tâm các lỗ có thể thay đổi. Lấy bỏ khối thạch trong lỗ đục. (Chú ý rằng nếu