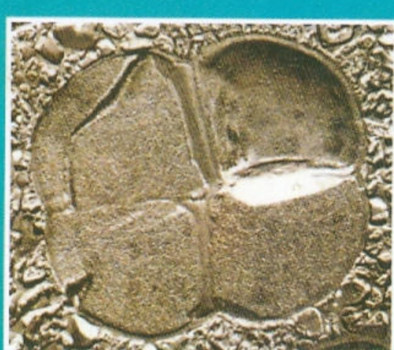
BỘ Y TẾ

VI SINH HỌC

SÁCH DÙNG ĐÀO TẠO DƯỢC SĨ ĐẠI HỌC



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

BỘ Y TẾ

VI SINH HỌC

(Sách dùng đào tạo dược sĩ đại học)

MÃ SỐ: Đ20Y03

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2006

CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN:

Vụ khoa học và Đào tạo, Bộ Y tế

CHỦ BIÊN

PGS. TS. Nguyễn Văn Thanh

BAN BIÊN SOẠN:

PGS. TS. Nguyễn Văn Thanh

ThS. Huỳnh Thị Ngọc Lan

TS. Trần Thu Hoa

ThS. Nguyễn Trọng Hiệp

THAM GIA TỔ CHỨC BẢN THẢO:

TS. Nguyễn Mạnh Pha

ThS. Phí Văn Thâm

LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện Nghị định 43/2000/NĐ-CP ngày 30/08/2000 của Chính phủ quy định chi tiết và hướng dẫn triển khai Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế đã phê duyệt, ban hành các chương trình khung cho đào tạo Dược sĩ Đại học. Bộ Y tế tổ chức thẩm định sách và tài liệu dạy - học các môn học cơ sở và chuyên môn theo chương trình mới nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong công tác đào tạo Dược sĩ Đại học ngành Y tế.

Sách được Khoa Dược Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh biên soạn dựa trên chương trình khung đã được Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế ban hành. Sách gồm ba phần chia làm 15 bài, mỗi bài được trình bày nổi bật các nội dung: mục tiêu, nội dung chuyên môn, câu hỏi lượng giá và tài liệu đọc thêm; đảm bảo yêu cầu cơ bản về kiến thức, tính chính xác và khoa học, cập nhật tiến bộ khoa học kỹ thuật vận dụng thực tiễn.

Nội dung tài liệu chủ yếu cung cấp những kiến thức cơ bản về vi sinh gây bệnh, cụ thể như cơ chế chuyển hoá của các quá trình trao đổi chất, các quá trình lên men vi sinh vật, cơ sở tác dụng của các chế phẩm probiotic. Ngoài ra còn giới thiệu bản chất của các đường lan truyền và cơ chế gây ra các bệnh nhiễm khuẩn thông thường và các bệnh hiểm nghèo như SARS, AIDS.

Đối tượng sử dụng sách, chủ yếu là sinh viên các trường đại học Dược. Ngoài ra, sinh viên các trường đại học khác cũng có thể sử dụng nó như tài liệu tham khảo. Xin trân trọng giới thiệu cùng bạn đọc.

Năm 2005 cuốn sách đã được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách giáo khoa và tài liệu dạy – học chuyên ngành Dược của Bộ Y tế thẩm định và được Bộ Y tế ban hành làm tài liệu dạy – học chính thức của Ngành Y tế trong giai đoạn hiện nay. Trong thời gian từ 3 đến 5 năm, sách cần được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật.

Vụ Khoa học và Đào tạo xin chân thành cám ơn PGS. TS. Nguyễn Văn Thanh và các giảng viên Khoa Dược Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh đã bỏ nhiều công sức để biên soạn cuốn sách này. Vì là lần đầu xuất bản nên chắc chắn không tránh khỏi thiếu sót, chúng tôi rất mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp và sinh viên để cuốn sách ngày càng có chất lượng tốt hơn.

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

MỤC LỤC

Lời giới thiệu 5

PHẦN I. VI SINH HỌC ĐẠI CƯƠNG 15

Bài 1. Giới thiệu vi sinh vật học 16

Đối tượng và nhiệm vụ của vi sinh học 16

Lược sử phát triển ngành vi sinh học 18

Phân loại vi khuẩn 23

Bài 2. Tế bào vi khuẩn 28

Hình dạng và cách sắp xếp tế bào vi khuẩn 28

Cấu trúc tế bào vi khuẩn 29

Bài 3. Dinh dưỡng và tăng trưởng của vi khuẩn 47

Dinh dưỡng vi khuẩn 47

Sự tăng trưởng của vi khuẩn 53

Ứng dụng 66

Bài 4. Sự trao đổi chất của vi sinh vật 77

Đại cương 77

Năng lượng và các quá trình phân giải đường hexose 78

Hô hấp 85

Quá trình hóa thẩm thấu của vi khuẩn 92

Oxy hóa không hoàn toàn 93

Lên men 97

Bài 5. Di truyền vi khuẩn 113

Vật liệu di truyền của vi khuẩn 113

Sự sao chép của nhiễm sắc thể vi khuẩn 113

Các kiểu sao chép ADN ở *E. coli* 114

Sự tái tổ hợp di truyền và sự truyền các tính trạng 116

PHẦN II. KHÁI NIỆM MIỄN DỊCH HỌC 132
Bài 6. Sự liên hệ giữa vật chủ và vi khuẩn 133
Đại cương 133
Năng lực phát sinh bệnh nhiễm 134
Bài 7. Kháng nguyên - kháng thể 141
Kháng nguyên 141
Kháng thể 145
Bài 8. Phản ứng huyết thanh 152
Đại cương 152
Đặc điểm của phản ứng huyết thanh 152
Các loại phản ứng huyết thanh 153
Kỹ thuật miễn dịch men (ELISA) 162
Bài 9. Phản ứng quá mẫn 165
Quá mẫn và miễn dịch 165
Phân loại 166
Phản ứng kiểu chậm 169
Bài 10. Sự đề kháng kháng sinh ở vi khuẩn 173
Phân loại 173
Cơ chế tác động của kháng sinh trên tế bào vi khuẩn 174
Cơ chế đề kháng kháng sinh của vi khuẩn 176
PHẦN III. VI SINH VẬT GÂY BỆNH 184
Bài 11. Vi khuẩn đường ruột 185
Phân loại 185
Đặc điểm nuôi cấy 186
Kháng nguyên 186
Độc tố 187
Vi khuẩn gây bệnh đường ruột 188
Bài 12. Vi khuẩn gây bệnh lây qua đường sinh dục 201
Vi khuẩn gây bệnh lậu: *Neisseria gonorrhoeae* 201
Vi khuẩn gây bệnh giang mai: *Treponema pallidum* 203

Vi khuẩn gây bệnh hạ cam mềm: *Haemophilus ducreyi* 207
Vi khuẩn gây viêm đường tiết niệu không phải lậu cầu 208
Bài 13. Vi khuẩn gây bệnh qua đường không khí 212
Bệnh do Streptococci 212
Mycobacterium tuberculosis 217
Vi khuẩn gây bệnh bạch hầu: *Corynebacterium diphteriae* 222
Não cầu khuẩn: *Neisseria meningitidis* 224
Phế cầu khuẩn: *Streptococcus pneumoniae* 226
Bài 14. Vi khuẩn gây bệnh ngoài da 230
Staphylococcus aureus 230
Vi khuẩn gây bệnh phong: *Mycobacterium leprae* 233
Bài 15. Virus gây bệnh 236
Cấu trúc 236
Phân loại 237
Quá trình nhân lên của virus 239
Tác động của virus nhiễm trên tế bào chủ 243
Chẩn đoán 244
Trị liệu 245
Những virus gây bệnh chủ yếu ở người 245
Đáp án 258

INDEX

Tiếng Anh	Tiếng Việt
Aerobic chemotroph bacteria	Vi khuẩn hoá tự dưỡng hiếu khí
AND	Acid desoxyribnucleic
Agglutination	Sự ngưng đập
Amphitrichaete	Lưỡng mao
Anatoxin	Giải độc tố
Antibiotic	Kháng sinh
Antibody	Kháng thể
Antigen	Kháng nguyên
Anti-serum	Huyết thanh kháng
ARN	Acid ribonucleic
Atopy	Tạng dị ứng
Autotrophic bacteria	Vi khuẩn quang tự dưỡng
Bacteria pathogene opportunity	Vi khuẩn gây bệnh cơ hội
Bacteria pathogene specific	Vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt
Bacteriocidal agent	Chất diệt khuẩn
Bacteriophage	Thực khuẩn thể
Bacteriostatic agent	Chất tẩy trùng
Capsid	Vỏ
Cell membrance	Màng tế bào chất
Cell wall	Thành tế bào
Chancre	Săng

Chemiosmosis	Quá trình hoá thẩm thấu
Chemotroph	Hoá dưỡng
Chromosome	Nhiễm sắc thể
Coevolution	Đồng tiến hoá
Commensal	Vi khuẩn hội sinh
Competence	Khả năng dung nạp
Complement	Bổ thể
Conjugation	Tiếp hợp
Contamination	Sự nhiễm
Delayed – type response	Phản ứng kiểu chậm
Detergent	Chất tẩy
Disinfection	Sự tẩy trùng
Donor	Tế bào cho
Electrochimic gradient	Chênh lệch điện hoá
Endogenose	Gen nội sinh
Endotoxin	Nội độc tố
Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	Định lượng miễn dịch liên kết men
Eukaryote	Tế bào nhân thật
Exogenose	Gen ngoại sinh
Exotoxin	Ngoại độc tố
Faculative anaerobe	Hiếu khí bắt buộc
Ferment	Lên men
Flagella	Tiên mao

Flocculation	Phản ứng kết bông
Fluorescent antibody technique	Kỹ thuật kháng thể huỳnh quang
F – prime	Hạt F
Genotype	Hệ gen
Growth factor	Yếu tố tăng trưởng
Hemagglutination	Phản ứng ngưng tập hồng cầu
Heterofermentative	Lên men dị hình
Heterotrophic bacteria	Vi khuẩn quang dị dưỡng
Hfr	Tần số tiếp hợp cao
Hft	Tần số tải nạp cao
Homofermentative	Lên men đồng hình
Immediate – type reaction	Phản ứng kiểu tức thời
Immune	Miễn dịch
Insertion sequence	Đoạn chèn
Lagging template	Mạch sau
Lagging strand template	Mạch khuôn sau
Lagging template	Mạch dẫn
Leading strand template	Mạch khuôn dẫn
Lipophile	Thân lipid
Lophotrichaete	Đa mao
Matting force	Lực tiếp hợp
Membrance permeability	Khả năng thấm qua màng
Merozygote	Hợp tử không hoàn toàn
Metabolism	Quá trình trao đổi chất

Methyl Red (MR)	Đỏ methyl
Microaerophile	Vi hiếu khí
Microbiology	Vi sinh vật học
Monocytic	Đơn bào
Monotrichaete	Đơn mao
Multinucleate	Cộng bào
Nucleotid	Thể nhân
Obligate aerobe	Hiếu khí bắt buộc
Obligate anaerobe	Kỵ khí bắt buộc
Ori	Origin of replication
Periplasma	Khoảng không quanh tế bào chất
Peritrichaete	Chu mao
Phototroph	Quang dưỡng
Potential energy	Thế năng
Primer	Mồi
Prokaryote	Tế bào nhân nguyên thủy
Prostista	Nguyên sinh vật
Protoplast	Thể nguyên sinh
Radio Immuno Assay (RIA)	Định lượng bằng miễn dịch phóng xạ
Receptor	Nơi nhận
Recipient	Tế bào nhận
Replicating fork	Chạc ba sao chép
Replication	Sự tái bản
Rolling circle mechanism	Cơ chế lăn vòng

Saprophyte	Vi khuẩn hoại sinh
Sex – factor	Yếu tố giới tính
Slide agglutination test	Phản ứng ngưng tập trên lam
Spore	Bào tử
Sterilisation	Sự tiệt trùng
Surface receptor	Thụ thể bề mặt
Temperate phage	Phage ôn hoà
Transduction	Tải nạp
Transformation	Biến nạp
Transposable genetic element	Yếu tố di truyền vận động
Transposon	Gen nhảy
Zygote	Hợp tử

Phần I

VI SINH HỌC ĐẠI CƯƠNG

Bài 1

GIỚI THIỆU VI SINH VẬT HỌC

MỤC TIÊU

1. *Nắm được đối tượng và nhiệm vụ của vi sinh học.*
2. *Thấy được vai trò lịch sử của việc phát hiện ra vi sinh vật.*
3. *Xác định được vị trí của vi sinh vật trong sinh giới.*
4. *Phân loại được vi khuẩn*

1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NHIỆM VỤ CỦA VI SINH HỌC

Vi sinh vật học (*microbiology*) là một khoa học nghiên cứu cấu tạo và hoạt động sống của vi sinh vật (từ tiếng Hy Lạp: *mikros* là nhỏ bé; *bios* là sự sống và *logos* là khoa học).

Trong một thời gian dài người ta đã chia sinh giới thành hai giới (*kingdom*): giới thực vật, không chuyển động nhưng có khả năng quang hợp và giới động vật, chuyển động được nhưng không có khả năng quang hợp.

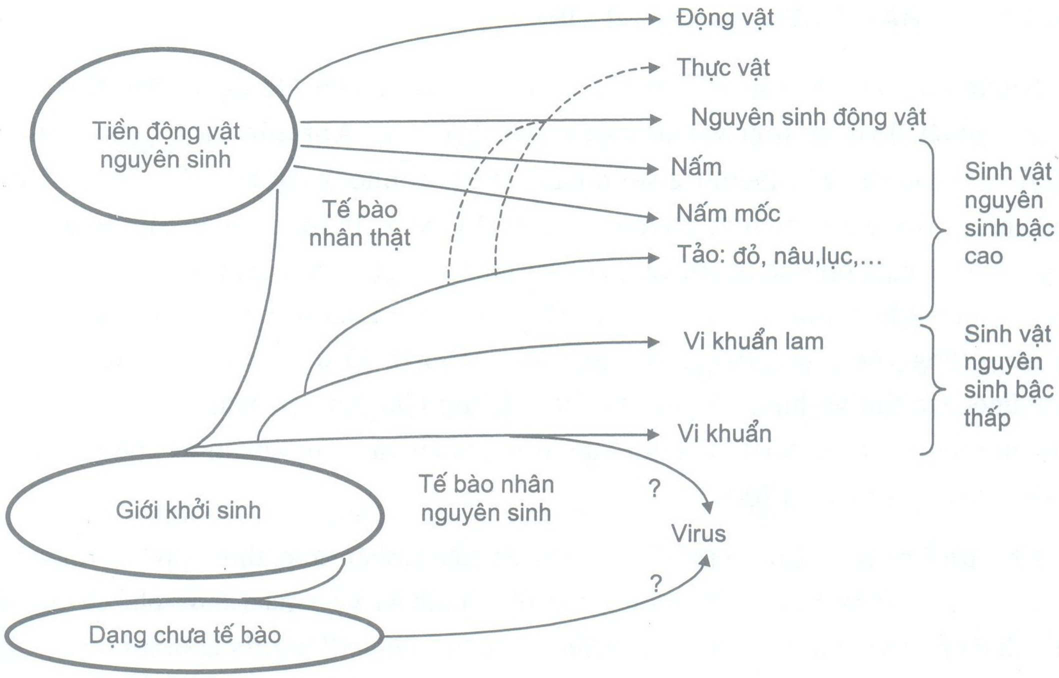
Năm 1866, nhà bác học người Đức Haeckel (1838 – 1919) đưa ra một giới sinh vật thứ ba là giới *sinh vật nguyên sinh (Protista)*. Đa phần sinh vật nguyên sinh là đơn bào hoặc cộng bào (*monocytic, multinucleate*) trong suốt chu trình sống của chúng, mặc dù có một số dạng lớn, đa bào, có cấu trúc bên ngoài giống thực vật, thí dụ như tảo biển và nấm (nấm đảm). Tuy nhiên, mô của những cơ thể này đều là những tập hợp các tế bào giống nhau với sự biệt hóa rất nguyên thủy, trong lúc đó thực vật và động vật dạng trưởng thành đa bào, biệt hóa cao, xen kẽ có những giao tử tạm thời.

1.1. Sinh vật nguyên sinh bậc cao

Gồm *động vật nguyên sinh* (*protozoa*), *tảo* (*algae*). Chúng chứa *tế bào nhân thật* (*eucaryotic cell*) giống như tế bào động vật, thực vật: nhân có màng nhân, nhiều nhiễm sắc thể trong mỗi nhân, có cơ quan phân bào. Cơ thể đơn bào hay đa bào, nếu đa bào thì không bao giờ hình thành mô.

1.2. Sinh vật nguyên sinh bậc thấp

Gồm tất cả *vi khuẩn* và một nhóm nhỏ *vi khuẩn lam* (*Cyanophyceae*). Đặc điểm bởi tế bào nhỏ, chưa có nhân thật (*procaryotic cell*), chỉ có *thể nhân* (*nucleus*) trong đó chứa một nhiễm sắc thể trần duy nhất, không có màng nhân.



Hình 1.1. Cây tiến hóa

Virus là hình thái vật chất sống đặc biệt không có cấu tạo tế bào. Kích thước của virus rất nhỏ 15 -350 nm, chỉ thấy được dưới kính hiển vi điện tử. Virus có bộ gen đa dạng. Bộ máy di truyền của virus có thể là ADN mạch kép, ADN mạch đơn, ARN mạch kép hay ARN mạch đơn. Bộ gen của virus thường là một phân tử acid nucleic ở dạng vòng hay thẳng. Virus nhỏ nhất có khoảng 4 gen, virus lớn nhất có khoảng vài trăm gen. Vỏ protein bọc bộ gen được gọi là *capsid* thường có thể ở dạng hình que, hình ống xoắn, hình đa diện hay phức tạp. Các capsid thường được tạo nên bởi một số lớn tổ hợp các phân tử protein gồm ít loại, được gọi là *capsomere*. Ví dụ, virus đốm thuốc lá có một capsid hình que dài, cứng, được tạo ra từ hơn 1000 capsomere. Virus không tạo màng lipid riêng, mặc dù một số virus có *màng bao* (envelope) được tạo ra bằng cách biến đổi màng của tế bào chủ trước khi thoát khỏi tế bào chủ. Màng bao còn chứa thêm các protein và glycoprotein nguồn gốc virus.

Virus không có sự tăng trưởng và sinh sản phân đôi như vi khuẩn mà bằng sự sao chép vật chất di truyền trong tế bào ký chủ.

Sự phát triển từ nhân nguyên thủy đến nhân thật là một bước nhảy vọt trong quá trình tiến hóa của sinh giới. Vi sinh vật học hiện đại đi sâu nghiên cứu từng nhóm vi sinh vật: *Virology* nghiên cứu virus, *Bacteriology* nghiên cứu vi khuẩn, *Mycology* nghiên cứu nấm, *Algology* nghiên cứu tảo, *Protozoology* nghiên cứu động vật nguyên sinh.

2. LƯỢC SỬ PHÁT TRIỂN NGÀNH VI SINH HỌC

Người có công phát hiện ra thế giới vi sinh vật và cũng là người đầu tiên mô tả hình thái nhiều loại vi sinh vật là một người Hà Lan, **Antonie van Leeuwenhoek** (1632-1723). Do yêu cầu kiểm tra vải nhuộm, Leeuwenhoek đã làm gần 400 kính hiển vi khác nhau, trong đó có chiếc phóng đại 270 lần. Năm 1676 vì muốn tìm hiểu tại sao rễ cây lại có vị cay, ông đã ngâm và quan sát những giọt nước ngâm. Ông hết sức ngạc nhiên vì đã phát hiện nhiều "dã thú" li ti. Dưới mắt của Leeuwenhoek, một số "dã thú" cũng gần giống với những động vật lớn, cũng có chân và đặc biệt có rất nhiều chân. Qua những bức thư và hình vẽ gửi cho Hội Hoàng Gia Anh (Royal Society) người ta biết thêm rằng Leeuwenhoek đã nhìn thấy trực khuẩn và xoắn khuẩn từ 1685, tìm thấy tập đoàn Volvox từ năm 1700.

Cho tới khi Karl Linné (1707-1778) tiến hành phân loại thực vật thì những tài liệu về vi sinh vật học cũng vẫn còn rất ít ỏi. Chính vì vậy mà Linné chỉ có thể xếp chung tất cả mọi vi sinh vật vào một "giống" gọi là " *chaos*", nghĩa là hỗn loạn.

Đến đầu thế kỷ 19, Pasteur xuất hiện như ông tổ của ngành vi sinh vật học thực nghiệm.

Louis Pasteur sinh ngày 27 tháng 12 năm 1822 tại thành phố Dolơ (Pháp). Năm 1848, tốt nghiệp đại học Ecole Normale của Pháp (Ecole Normale Supérieure). Năm 32 tuổi (1854) ông được bầu làm giáo sư hóa học của trường Đại học Tổng hợp Lille miền Nam nước Pháp. Năm 1888, ông được bầu là viện trưởng viện Pasteur ở Paris cho đến khi qua đời.

Những cống hiến chủ yếu của ông:

- 1854 - 1864: Chứng minh nhiều quá trình lên men là do vi sinh vật gây ra.
- 1862: Phủ định học thuyết tự sinh.
- 1863: Chứng minh vi khuẩn là nguồn gốc của bệnh than.
- 1865: Phát hiện ra nguyên nhân của bệnh bào tử trùng ở tằm và đề xuất phương pháp phòng tránh.
- 1877: Phát hiện các phẩy khuẩn gây bệnh.
- 1880: Phát hiện các tụ cầu khuẩn gây bệnh.

Tìm ra vaccin chống bệnh dịch tả gà.

Phát hiện não mô cầu khuẩn (cùng với Chamberland, Roux và Thuiller).

– 1881: Tìm ra vaccin chống bệnh than.

– 1880 – 1885: Nghiên cứu vaccin chống bệnh dại.

Tiếp sau Pasteur phải kể đến bác sĩ Đức Robert Koch (1843-1910). R. Koch là người đầu tiên phát hiện ra vi khuẩn lao (Bacille de Koch) vào năm 1882 và phẩy khuẩn tả vào năm 1883.

Học trò của R. Koch là Julius Richard Petri (1852-1921) đã thiết kế ra một loại hộp thủy tinh (về sau mang tên ông) giúp cho việc phân lập và nuôi cấy vi khuẩn. Koch cũng là người xây dựng nên các kỹ thuật nhuộm màu tiêu bản vi sinh vật. Về mặt này còn phải nhắc đến Ehrlich (1881), Ziehl và Neelsen (1883), Loeffler (1884), Gram (1884).

Nhà vi sinh vật học người Nga X. I. Vinogratski (1856-1953) và nhà vi sinh học Hà Lan M. W. Beijerinck (1851-1931) đã đặt nền móng cho vi sinh vật học đất. Vinogratski đã sáng tạo ra " *phương pháp nuôi cấy chọn lọc* " và nhờ đó ông đã có các công trình xuất sắc về vi khuẩn lưu huỳnh (1887), vi khuẩn sắt (1880), vi khuẩn nitrat hóa (1890). Beijerinck cũng tìm ra phương pháp tương tự -"*phương pháp nuôi cấy tích lũy* ". Ông là người đầu tiên đã phân lập ra vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn nốt sần, vi khuẩn lên men butyric, vi khuẩn phân giải pectin và một số loại vi khuẩn lưu huỳnh.

Năm 1872, lần đầu tiên trong lịch sử, nhà thực vật học Nga Ivanovski (1864-1920) đã tìm ra vi sinh vật gây *bệnh đốm thuốc lá* (*mosaique*). Năm 1895, nhà bác học Hà Lan Beijerinck cũng tìm thấy những kết quả tương tự. Ông gọi vi sinh vật siêu hiển vi này là " *virus qua lọc* " (virus theo tiếng Latin là nọc độc).

Về sau người ta liên tiếp tìm ra các loại virus gây bệnh ở người và động vật như virus gây lở mồm và long móng ở trâu bò (F. Loeffler, 1898); virus sốt vàng (W. Reed, 1901); virus viêm tủy xám (K. Landsteiner, E. Popper, 1908-1909); virus thủy đậu (Aragao, E. Paschen, 1911-1917); virus cúm (U. Smith, H. Andrewes, P. Laidlaw, 1933); virus quai bị (C. Johson, E. Goodpasture, 1934); viêm não Nhật Bản (M. Hayshi, A. A. Smorodinsev, 1934-1938); virus sởi (H. Plotz, 1938); virus sốt xuất huyết (A. A. Smorodinsev, A. N. Chumakov, 1940-1946); virus viêm gan truyền nhiễm (G. Findlay, F. Mc. Collum, W. Raitsell, 1942-1962); virus Coxsackie và ECHO (G. Doldorfy, T. Endars, G. Meinick, 1948-1956); Adenovirus (W. P. Row, 1953).

Người đầu tiên phát hiện thấy virus ký sinh trên vi khuẩn là nhà vi sinh vật Anh F. W. Twort (1877-1950). Hai năm sau nhà vi khuẩn học Canada F. D'herelle (1873-1949) cũng đã quan sát thấy vi khuẩn "đã trở thành vật hy sinh cho những ký sinh trùng nhỏ bé hơn" và ông gọi các virus ký sinh trên vi khuẩn là *thực khuẩn thể* (*phage* hay *bacteriophage*- chữ "phage" xuất phát từ chữ "phageen" tiếng Hy Lạp nghĩa là ăn).

Người đóng góp nhiều trong cuộc đấu tranh chống bệnh truyền nhiễm là nhà vi sinh vật học Nga Metchnikoff (1845-1916) với học thuyết " *thực bào* " nổi tiếng.

Về phương diện ứng dụng các thành tựu của ngành vi sinh vật học trong chữa bệnh cần phải nhắc tới nhà phẫu thuật học người Anh Joseph Lister (1827-1912), là người đầu tiên ứng dụng các nguyên lý khử trùng của Pasteur vào ngành phẫu thuật. Nhờ dùng biện pháp khử trùng dụng cụ và biện pháp xử lý vết thương bằng phenol mà Lister đã làm thay đổi rất rõ rệt tỷ lệ tử vong vì nhiễm trùng khi mổ.

Người đi đầu trong lĩnh vực sử dụng các chất tổng hợp hóa học để ức chế một cách đặc hiệu các nhóm vi sinh vật gây bệnh là nhà vi khuẩn học Đức P. Ehrlich (1854-1915). Ông đã tìm ra thuốc nhuộm *Tripanoxic* có tác dụng ức chế *Trypanosoma* và đến năm 1909 cùng với những người cộng tác ông đã tổng hợp ra thuốc *Salvarsan* (cũng chứa nguyên tố arsen như Tripanoxic). Thuốc này về sau được chuyển thành dạng muối natri cho đỡ độc hơn (gọi là chế phẩm 914) và được dùng để điều trị bệnh giang mai. Đến năm 1934 thì Domagk phát hiện ra *Prontozin*, chuyển hóa chất đầu tiên thuộc loại sulfanilamid.

Năm 1929, nhà vi khuẩn học người Anh Alexandre Fleming (1881-1955) lần đầu tiên phát hiện ra tác dụng ức chế vi khuẩn của một chất được sinh ra từ nấm *Penicillium notatum* và đặt tên cho nó là *Penicillin*. Mười hai năm sau, nhờ những nỗ lực phi thường của Walter Florey và Enet Chain mà người ta nhận được chế phẩm *Penicillin* tinh khiết. Từ đó mở ra một kỷ nguyên mới trong lịch sử đấu tranh chống bệnh truyền nhiễm: kỷ nguyên kháng sinh

Ngày nay nhờ có máy siêu âm phá vỡ tế bào và màng, tách từng cấu trúc của tế bào, người ta có thể có trong tay từng loại cấu trúc tham gia xây dựng cơ thể vi sinh vật. Nhờ kỹ thuật chiếu xạ tia X và việc sử dụng kính hiển vi điện tử, người ta đã biết rõ cấu trúc không gian của các hợp chất cao phân tử có ý nghĩa quan trọng trong hoạt động sống (protein, acid nucleic ...).

Vi sinh vật, ngoài ý nghĩa quan trọng đối với các ngành y học, thú y học, bảo vệ thực vật, chăn nuôi, trồng trọt, bảo quản ... giờ đây còn trở thành mô hình lý tưởng đối với việc nghiên cứu các qui luật cơ bản của sự sống. Phát hiện sự biến đổi di truyền ở vi khuẩn nhờ tiếp thu *acid desoxyribonucleic* (ADN) của một vi khuẩn khác, đó là hiện tượng *biến nạp*; hiện tượng chuyển vật chất di truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác nhờ thực khuẩn thể. Những nghiên cứu mới nhất về sự tổng hợp các bản sao ADN và ARN, về khả năng tổng hợp gen ngoài cơ thể và ngoài tế bào được thực hiện trên các mô hình của vi khuẩn và virus.

Kỷ nguyên sinh học đang bắt đầu từ những năm cuối của thế kỷ XX, trong đó loài người đang đi vào bản chất của sự sống ở mức độ phân tử, dưới phân tử, thời kỳ tháo lắp gen ở vi sinh vật và ứng dụng nó vào việc chữa bệnh di truyền.

Bảng 1.1. Những phát hiện quan trọng về vi sinh vật gây bệnh

Năm	Loại	Tác nhân gây bệnh	Bệnh
1868-1873	Vi khuẩn	*Borrelia recurrentis*	Sốt hồi qui
1873-1874	Vi khuẩn	*Mycobacterium leprae*	Phong (hủi)
1880	Vi khuẩn	*Salmonella typhi*	Thương hàn
1882	Vi khuẩn	*Mycobacterium tuberculosis*	Lao
1883	Vi khuẩn	*Vibrio cholerae*	Tả
1883-1884	Vi khuẩn	*Corynerbacterium diphtheriae*	Bạch hầu
1884	Vi khuẩn	*Clostridium tetani*	Uốn ván
1887	Vi khuẩn	*Neisseria menigitidis*	Viêm màng não
1891-1898	Vi khuẩn	*Shigella* spp.	Lỵ
1892-1906	Virus	Virus đậu mùa	Đậu mùa
1894	Vi khuẩn	*Yersinia pestis*	Dịch hạch
1896	Vi khuẩn	*Clostridium botulinum*	Ngộ độc thịt
1901	Virus	Virus sốt vàng	Sốt vàng
1905	Vi khuẩn	*Treponema pallidum*	Giang mai
1908-1909	Virus	Virus bại liệt	Bại liệt
1933	Virus	Virus cúm	Cúm
1934-1938	Virus	Virus viêm não Nhật Bản	Viêm não Nhật Bản
1940-1946	Virus	Virus Dengue	Sốt Dengue
1942-1962	Virus	Virus viêm gan	Viêm gan truyền nhiễm
1973	Virus	Rotavirus	Tiêu chảy trẻ em
1975	Virus	Parvovirus	Thiếu máu tiêu huyết bất sản
1976	Ký sinh trùng	*Cryptosporodium parvum*	Tiêu chảy cấp và kinh niên
1977	Vi khuẩn	*Legionella pneumophilla*	Bệnh "cựu chiến binh"
1977	Vi khuẩn	*Campylobacter jejuni*	Bệnh đường ruột phát tán
1977	Virus	Hantaan virus	Sốt xuất huyết với hội chứng thận
1980	Virus	Hepatitis D virus	Viêm gan virus D

Năm	Loại	Tác nhân gây bệnh	Bệnh
1980	Virus	Human-T-Lymphotropic Virus (HTLV-1)	U bạch cầu tế bào lympho T ở người
1981	Vi khuẩn	Chủng *Staphylococcus aureus* tạo độc tố	Hội chứng sốc tụ cầu
1982	Vi khuẩn	*Escherichia coli* O157: H7	Viêm kết tràng xuất huyết, hội chứng ure huyết - tan huyết
1982	Virus	HTLV-2	Ung thư bạch cầu tế bào lympho T ở người
1982	Vi khuẩn	*Borrelia burgdorferi*	Bệnh Lyme
1983	Virus	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	HIV/AIDS
1983	Vi khuẩn	*Helicobacter pylori*	Viêm loét dạ dày
1985	Ký sinh trùng	*Enterocytozoon bieneusi*	Bệnh tiêu chảy khó cầm (persistent diarrhoea)
1986	Ký sinh trùng	*Cyclospora cayetannesis*	Bệnh tiêu chảy khó cầm
1988	Virus	Human herpesvirus 6 (HHV-6)	Bệnh sốt phát ban đào (exanthem subitum)
1988	Virus	Hepatitis E virus	Viêm gan virus E (Enterically transmitted non A, non B hepatitis
1989	Vi khuẩn	*Ehrlichia chaffoensis*	Bệnh Ehrlich
1989	Virus	Hepatitis C virus	Viêm gan virus C (Parenterally non A, non B liver hepatitis)
1991	Virus	Guanarito virus	Sốt xuất huyết Venezuela
1991	Ký sinh trùng	*Encephalitozoon hellem*	Viêm kết mạc (đau mắt đỏ phát tán)
1991	Ký sinh trùng	*Babesia*	Bệnh Babesia không điển hình
1992	Vi khuẩn	*Vibrio cholerae* O139	Chủng dịch tả mới, đôi khi gây thành dịch
1992	Vi khuẩn	*Bartonella henselae*	Bệnh sốt mèo quào, u mạch do vi khuẩn
1993	Virus	Sin Nombre virus	Hội chứng phổi Hantavirus

Năm	Loại	Tác nhân gây bệnh	Bệnh
1993	Ký sinh trùng	*Encephalitozoon cuniculi*	Bệnh phát tán
1994	Virus	Sabia virus	Sốt xuất huyết Brazil
1995	Virus	Human herpesvirus B	Bệnh kết hợp ung thư Kaposi trong bệnh AIDS
1996		Tác nhân BSE	Bệnh não xốp, có thể lây từ bệnh bò điên

3. PHÂN LOẠI VI KHUẨN

Vi khuẩn, cũng như tất cả mọi sinh vật khác đều được sắp xếp vào những hệ thống phân loại nhất định. Đơn vị cơ bản trong phân loại là loài (species).

Các đơn vị trên loài gồm: Chi, tộc, họ, phụ bộ, bộ

Chi: Genus.

Tộc: Tribe, thường có tên tận cùng bằng eae, ví dụ *Escherichieae.*

Họ: Family, thường có tên tận cùng bằng aceae, ví dụ: *Thiorhodaceae.*

Phụ bộ: Suborder, thường có tên tận cùng bằng ineae, ví dụ: *Rhodobacteriineae.*

Bộ: Order, thường có tên tận cùng bằng ales, ví dụ: *Pseudomonales.*

Mỗi loài vi khuẩn (cũng như các sinh vật khác) đều được mang một tên khoa học. Tên này được đặt theo nguyên tắc "*danh pháp kép*" (*binomial*) của Linné (Carolus Linnaeus = Carl von Linné, 1707-1778). Trong tên này từ thứ nhất chỉ tên chi, còn từ thứ hai chỉ tên loài. Ví dụ: *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* …

Trong quá trình phát triển của khoa học phân loại, đôi khi tên của một loài được thay đổi theo từng nhà nghiên cứu. Để tiện theo dõi, sau tên loài, người ta còn chú thích thêm tên tác giả. Có khi người ta ghi tên nhiều tác giả sau tên loài. Ví dụ: vi khuẩn lao, trước kia được R. Koch đặt tên là *Bacterium tuberculosis*, về sau Lehman và Neumann xác định vi khuẩn này thuộc chi *Mycobacterium*, do đó tên của nó được viết là *Mycobacterium tuberculosis* (Koch) Lehman et Neumann. Có những vi khuẩn lần lượt được các nhà nghiên cứu thay bằng rất nhiều tên khác nhau, những tên này được gọi là đồng danh (synonym) với nhau. Chẳng hạn tụ cầu vàng lần lượt được gọi là *Staphylococcus pyogenes* Rosenbach (1884); *Micrococcus pyogenes* Lehman et Neumann (1896); *Micrococcus aureus* (Rosenb.) Nigula (1900); *Staphylococcus mastitidis aureus* Lux (1903); *Aurococcus aureus* (Rosenb.) Winslow (1908); *Staphylococcus aureus* Bergey (1939).

Các đơn vị dưới loài gồm có: Thứ, dạng/ mẫu và chủng.

Thứ (variety): Dùng để chỉ một nhóm trong một loài nào đó. Ví dụ: *Mycobacterium tuberculosis var.hominis* (vi khuẩn lao ở người), *Mycobacterium tuberculosis var.bovis* (vi khuẩn lao ở bò), *Mycobacterium tuberculosis var. avium* (vi khuẩn lao ở chim).

Dạng (form), ***mẫu*** (type): Chỉ một nhóm nhỏ hơn thứ, chẳng hạn người ta đã căn cứ vào các đặc tính khác nhau về phản ứng huyết thanh mà chia phế cầu khuẩn *Diplococcus pneumoniae* thành 80 mẫu khác nhau, trong đó có các mẫu I, II, III là những dạng có độc tính mạnh nhất.

Chủng (strain): Là một thuật ngữ riêng để chỉ một loài sinh vật mới được phân lập thuần khiết từ một cơ chất nào đó. Các chủng là những cá thể nhưng được phân lập từ những nơi khác nhau, thậm chí cùng một nơi nhưng ở các lớp đất khác nhau. Các chủng thường được ký hiệu bằng những con số, những chữ cái theo qui ước của nhà nghiên cứu. Ví dụ: chủng *Bacillus subtilis* B. F. 7658, *Azotobacter vineladnii* THi-70, *E. coli* O157.

Từ trước đến nay đã có nhiều hệ thống phân loại khác nhau: Muller (1786), Ehrenberg (1838), Cohn (1872, 1875), Migula (1897), Orla-Jenxen (1909), Lehman và Neumann (1924, 1926). Nhưng ngày nay thông dụng nhất vẫn là hệ thống phân loại của Bergey (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994).

3.1. Phân loại dựa vào hình thái

Các đặc điểm cần chú ý khi nghiên cứu một chủng vi khuẩn

- Đặc điểm nơi phân lập gồm địa điểm, cơ chất, điều kiện sinh thái, thời gian lấy mẫu.
- Đặc điểm hình thái

1. Bình thường: hình dạng, cách sắp xếp, kích thước, đặc điểm tế bào, vỏ nhày, tiêm mao (số lượng, cách phân bố), các thể vùi ...
2. Bất thường: xuất hiện khi nào, hình thái tế bào.
3. Nhuộm màu Gram (nuôi cấy 1, 2, 3, 4 ngày).
4. Nhuộm bào tử: có hay không có bào tử, hình dạng, kích thước, vị trí của bào tử.

- Đặc điểm nuôi cấy

Mức đã phát triển, trạng thái khuẩn lạc (hạn chế, lan, phân nhánh), đặc điểm mép khuẩn lạc, đặc tính bề mặt (trơn, bóng, xù xì), tính chất khuẩn lạc (trong, đục, ướt, khô, đặc, dai, nhày ...), màu sắc, mùi ...

- Đặc điểm sinh lý

1. Khả năng chịu nhiệt: nhiệt độ thấp nhất và cao nhất.
2. Khả năng chịu đựng với pH môi trường: phạm vi pH có thể sinh trưởng và pH tối thích.
3. Khả năng hình thành sắc tố: trên môi trường chuyên biệt.
4. Tác dụng đối với sữa: có khả năng làm ngưng kết và làm pepton hóa sữa, phản ứng khử litmus và làm mất màu xanh methylen.
5. Nhu cầu oxy: hiếu khí, kỵ khí bắt buộc hay kỵ khí không bắt buộc (kỵ khí tùy ý).
6. Khả năng khử nitrat.
7. Khả năng khử indol.
8. Khả năng sinh H_2S.
9. Khả năng huyết giải.
10. Khả năng lên men (sinh acid, sinh khí): các loại đường đơn, đường kép, đường phức, rượu.
11. Khả năng gây bệnh.
12. Đặc tính kháng nguyên (phản ứng huyết thanh).
13. Các điểm khác: phản ứng MR (đỏ methyl), phản ứng VP (Voges-Proskauer), khả năng thủy giải tinh bột, lipid, khả năng phân giải uré, khả năng đồng hóa citrat ...

3.2. Phân loại dựa vào ADN

Gần đây, người ta chú ý nhiều đến khả năng vận dụng kết quả phân tích sinh hóa trong lĩnh vực phân loại vi khuẩn. Những công trình nghiên cứu xuất sắc của E. Chargaff (1955), A. N. Belozerski và A. X. Spirin (1957-1960) đã chứng tỏ rằng ADN của mỗi loài sinh vật có một thành phần riêng biệt. Nói cách khác ADN mang tính chất đặc trưng cho loài.

Từ khi biết được thông tin di truyền được mã hóa trong ADN, chúng ta có thể định rõ được khái niệm về quan hệ tiến hóa của các cơ thể sinh vật một cách chuẩn xác hơn với những ngôn ngữ thao tác: độ đồng nhất của ADN. Cơ thể ngày càng trôi dạt xa hơn trên con đường tiến hóa, trải qua sự tích lũy đột biến, thì gen của chúng không chỉ mã hóa cho những cấu trúc và chức năng khác nhau mà ngày càng khác biệt rõ rệt trong trình tự sắp xếp của các base nitơ.

Tỉ lệ base nitơ có thể là công cụ chứng minh quan hệ họ hàng giữa những cơ thể khác nhau. Người ta thấy rằng tỷ lệ base của ADN trong động vật có xương sống là 40% mole GC và 60% mole AT, còn ở vi khuẩn thì GC biến thiên từ 30 đến 70% mole. Tỷ lệ $\frac{G+C}{A+T}$ trong phân tử ADN là khác nhau đối với từng loài sinh vật. Mỗi loài thực vật, động vật, vi sinh vật đều có một thành phần acid nucleic xác định. Các loài càng khác nhau về mặt phân loại thì sự khác biệt về thành phần ADN càng lớn. Tính chất đặc trưng về thành phần ADN biểu hiện đặc biệt rõ ở vi sinh vật nói chung và vi khuẩn nói riêng.

Theo Belozerski (1970), ở vi khuẩn tỷ lệ $\frac{G+C}{A+T}$ có thể thay đổi từ 0,45 – 2,8 (nghĩa là chênh lệch nhau hơn 6 lần). Trong khi đó giữa các nhóm thực vật và động vật khác nhau tỷ lệ này chỉ thay đổi trong phạm vi 0,54 – 0,94 (nghĩa là chênh lệch nhau chưa đến hai lần).

Hơn thế nữa, nhiễm sắc thể của vi khuẩn đặc biệt đồng nhất, điều này được biểu hiện trong sự trầm tích thành những phần nhỏ sau khi tách đoạn (fragmentation). Như vậy thành phần base ADN của cơ thể hiển nhiên là đặc điểm ổn định trong suốt lịch sử tiến hóa lâu dài. Song điều này đôi khi cũng có ngoại lệ. Thí dụ, thành phần GC (38 - 40%) giống nhau được tìm thấy ở Streptococci, Pneumococci và Lactobacilli, những chi từ trước đến nay vẫn được xếp vào nhóm vi khuẩn lactic vì có quá trình lên men giống nhau, thế nhưng *Lactobacillus bifidus* thì lại có tỷ lệ GC rất khác (56% GC).

Tương tự như vậy, mặc dù Proteus từ trước đến nay vẫn được xếp chung với Enterobactericeae, song một số loài của nó lại có tỷ lệ GC giống nhau (50 - 52%) rất xa với đa số loài trong họ này (38 - 40%).

Cuối cùng, sự yếu ớt của việc sử dụng hình thái làm tiêu chuẩn phân loại chủ yếu đã được chứng minh bởi vị trí không bình thường của *Sporosarcina ureae*, là cầu khuẩn duy nhất sinh bào tử. Loài này được xếp vào các loại trực khuẩn sinh bào tử (Bacilli và Clostridia) có thành phần GC là 38 - 40% và rất xa với tất cả các loài Sarcina khác có 70 - 80% GC.

Sự tương đồng về thành phần base chỉ là những cơ sở tối thiểu cho quan hệ di truyền, vì cơ thể có thể có thành phần base giống nhau nhưng có thể có trình tự sắp xếp các base khác nhau.

Vì vậy, ngày nay, trong việc xác định loài, người ta chú ý nhiều đến sự tương đồng của trình tự sắp xếp của các base ADN (homology of ADN sequence).

Bằng phương pháp PCR (polymerase chain reaction), kết hợp với lai phân tử (hybridization) người ta có thể định danh nhanh chóng và chính xác vi khuẩn gây bệnh. Dựa vào gen 16S rARN, phát hiện ra *Campylobacter coli, C.jejuni, C. lari*. Dựa vào gen đích gen ial, phát hiện ra *E.coli, Shigella bogdii, S.dysenteriae, S.flexneri, S.sonnei*. Dựa vào gen LT phát hiện *E.coli* tạo độc tố đường ruột. Dựa vào gen 5S rARN phát hiện *Lactobacillus brevis* và *Sacchrosemyces serevisiae*. Dựa vào vùng 3' của gen hlyA phát hiện *Listeria monocytogenes*. Dựa vào gen ctxAB phát hiện *Vibrio cholerae* O1.

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. ***Vi sinh vật học***. 2001. NXB Giáo Dục.
2. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993.
3. Claire Michèle Bacq – Calberg, Jacques Coyette, Philippe Hoet et Martine Nguyen – Distèch. ***Microbiologie.*** 4th edition. 2002. De Boeck Universite.

Bài 2

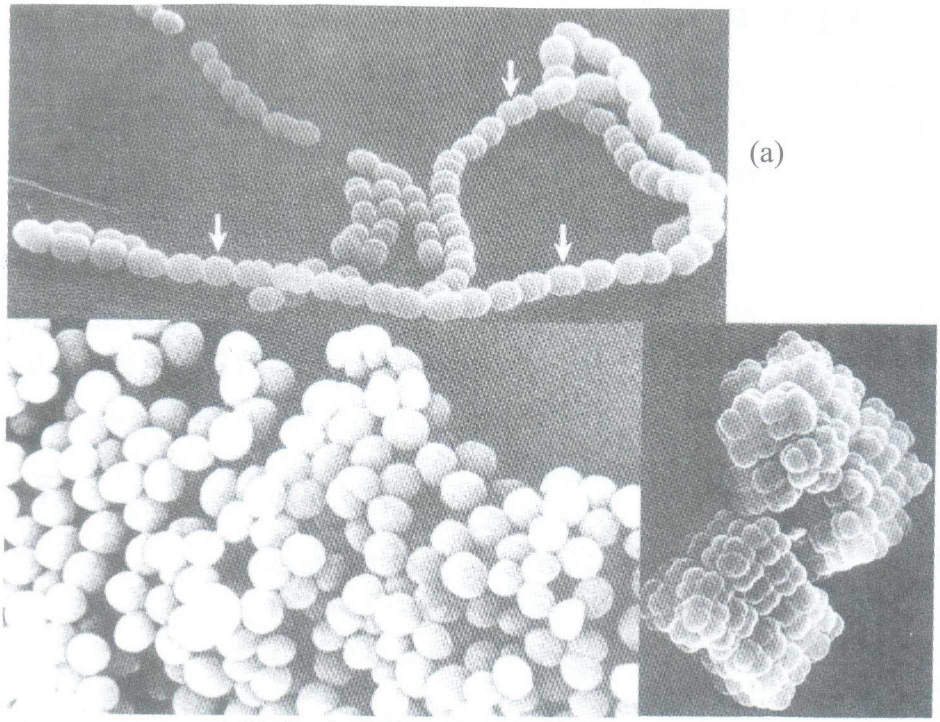
TẾ BÀO VI KHUẨN

MỤC TIÊU

1. *Vẽ được cấu trúc một tế bào vi khuẩn đồng thời nêu được những bộ phận bắt buộc và không bắt buộc.*
2. *Phân biệt được cấu trúc thành tế bào vi khuẩn Gram dương và thành tê bào vi khuẩn Gram âm.*
3. *Kể được các nhiệm vụ của mỗi bộ phận trong cấu trúc tế bào vi khuẩn.*
4. *Ứng dụng để nuôi dưỡng và diệt tế bào vi khuẩn.*

1. HÌNH DẠNG VÀ CÁCH SẮP XẾP TẾ BÀO VI KHUẨN

– Nhìn dưới kính hiển vi quang học, tất cả các vi khuẩn có ba dạng sau: cầu khuẩn, trực khuẩn, xoắn khuẩn (hình 2.1).



(a)

(b)

(c)

Hình 2.1. Ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử ba dạng xắp xếp của cầu khuẩn
(a) Một loài thuộc chi *Streptococcus* tìm thấy trong ruột (mũi tên chỉ vị trí tại đó cầu khuẩn đang phân bào).
(b) *Staphylococcus aureus* xắp xếp dạng chùm nho.
(c) Các khối lập phương gồm 8 tế bào của Sarcina (x 15000).

1.1. Cầu khuẩn

Tế bào dạng tròn (*Staphylococcus aureus*), đôi khi có dạng bầu dục (*Streptococcus faecalis*) hoặc dạng lõm ở một cạnh (*Nesseria*).

Cách sắp xếp của cầu khuẩn rất đặc sắc, có tính cách phân loại:

- Xếp thành hình chùm nho. Ví dụ: *Staphylococcus aureus.*
- Xếp thành chuỗi. Ví dụ: *Streptococcus pyogenes.*
- Xếp cặp đôi. Ví dụ: *Pneumococcus pneumoniae.*
- Xếp thành bó. Ví dụ: *Sarcina lutea.*

1.2. Trực khuẩn

Dạng que dài (20 μm) hoặc ngắn (0,5 μm).

Cách sắp xếp tế bào của trực khuẩn không đặc sắc, phần lớn xếp riêng rẽ. Tuy nhiên có một số loại có cách sắp xếp đặc biệt:

- Xếp thành chuỗi dài gọi là liên trực khuẩn *(Streptobacilli)*. Ví dụ: Bacillus.
- Xếp hình hàng rào. Ví dụ: *Corynerbacterium diphteriae.*

1.3. Xoắn khuẩn (Spirochete)

Một vài xoắn khuẩn gọi là Vibrio, tế bào loại này có dạng cong gần giống dấu phẩy.

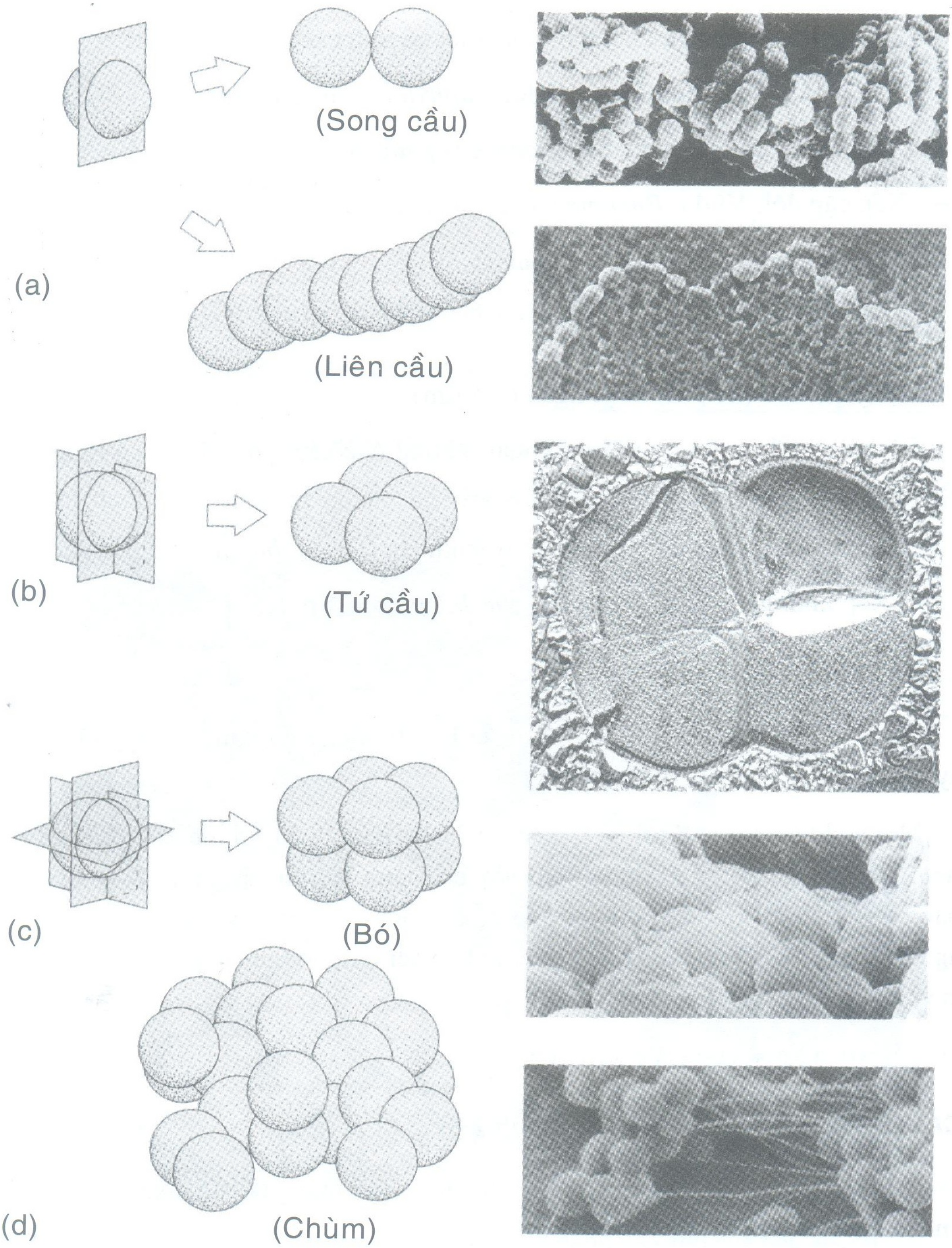
Một số khác gọi là Spirilla, tế bào có dạng xoắn và có sợi ở đầu giống sợi tóc gọi là tiêm mao (flagella) để di động, loại này có thành tế bào cứng rắn. Một số có thành tế bào mềm dẻo và không có tiêm mao để di động (ví dụ: vi khuẩn giang mai), sự di động của loại này nhờ sự co lại của những nội tiêm mao (endoflagella) chạy dọc trong thân vi khuẩn.

Các xoắn khuẩn đều sắp xếp riêng rẽ.

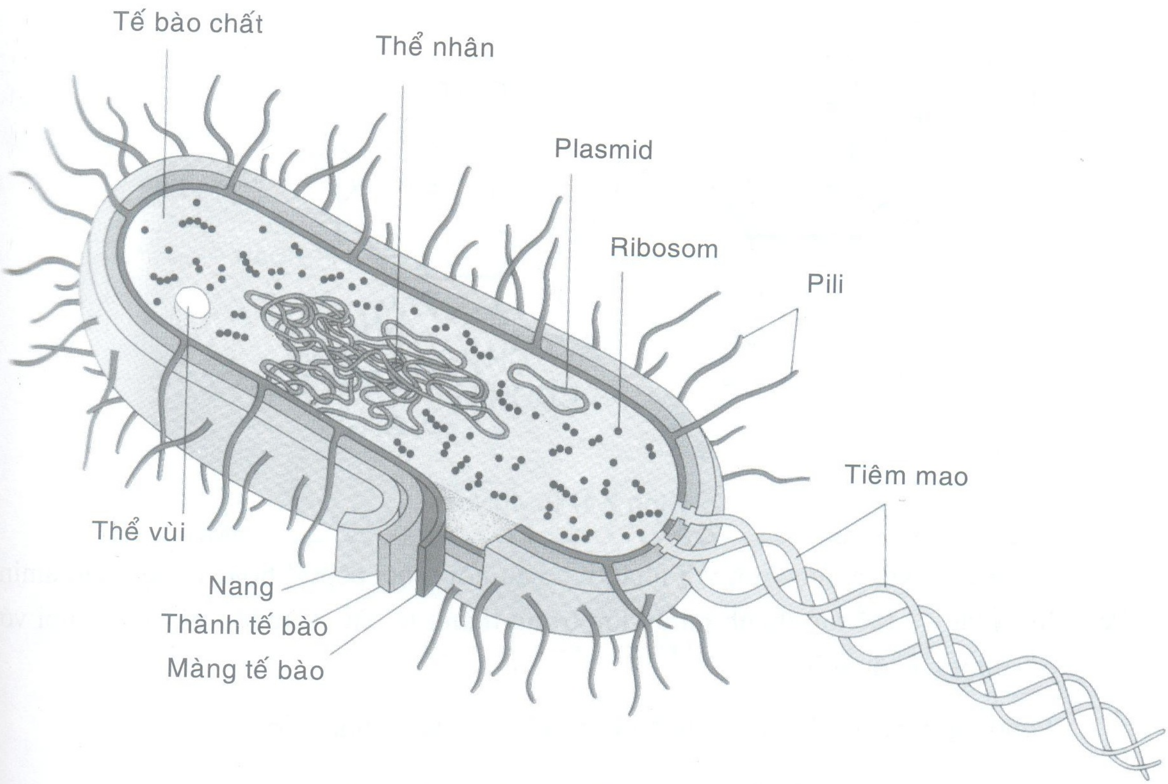
2. CẤU TRÚC TẾ BÀO VI KHUẨN (hình 2.3)

Những bộ phận bắt buộc phải có: Thành tế bào, màng tế bào chất, tế bào chất với thể nhân và ribosom.

Những bộ phận không bắt buộc: Tiêm mao, pili, nang, bào tử, plasmid, hạt dự trữ.



Hình 2.2. Các cách sắp xếp khác nhau của tế bào vi khuẩn



Hình 2.3. Cấu trúc tế bào vi khuẩn

2.1. Những bộ phận bắt buộc

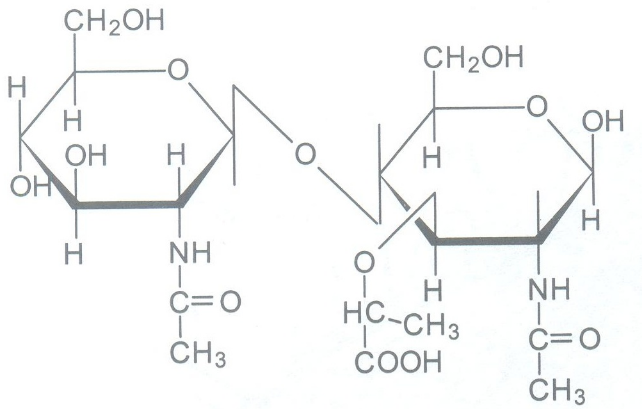
Thành tế bào vi khuẩn

Ngoại trừ *Mycoplasma*, tất cả các vi khuẩn đều có thành tế bào. Thành tế bào có nhiệm vụ bảo vệ và giữ vững hình dạng tế bào vi khuẩn.

Thành tế bào vi khuẩn Gram dương

Thành phần hóa học quan trọng của thành tế bào vi khuẩn Gram dương là *peptidoglycan* (còn gọi là *glycopeptid*). Lớp này dày khoảng 25 nm, chiếm 60 - 90% thành tế bào, trong khi lipid chiếm tỷ lệ rất thấp 1 - 2 %.

Peptidoglycan là một cao phân tử cấu tạo bởi dây glycan (hình 2.4) và chuỗi peptid gồm 4 acid amin (mucopeptid). Dây glycan là "xương sống" của peptidoglycan, cấu tạo bởi những phân tử N - acetylglucosamin và N - acetyl muramic acid liên kết xen kẽ nhau.



Hình 2.4. Dây glycan

Các dây glycan được nối với nhau bởi cầu nối mucopeptid hoặc chuỗi acid amin. Peptidoglycan có thể tạo thành nhiều lớp trong thành tế bào. Các lớp này được nối với nhau bởi chuỗi acid amin.

Peptidoglycan ở những vi khuẩn khác nhau sẽ khác nhau do:

- Dây glycan khác nhau.
- Mucopeptid khác nhau.
- Chuỗi acid amin khác nhau.

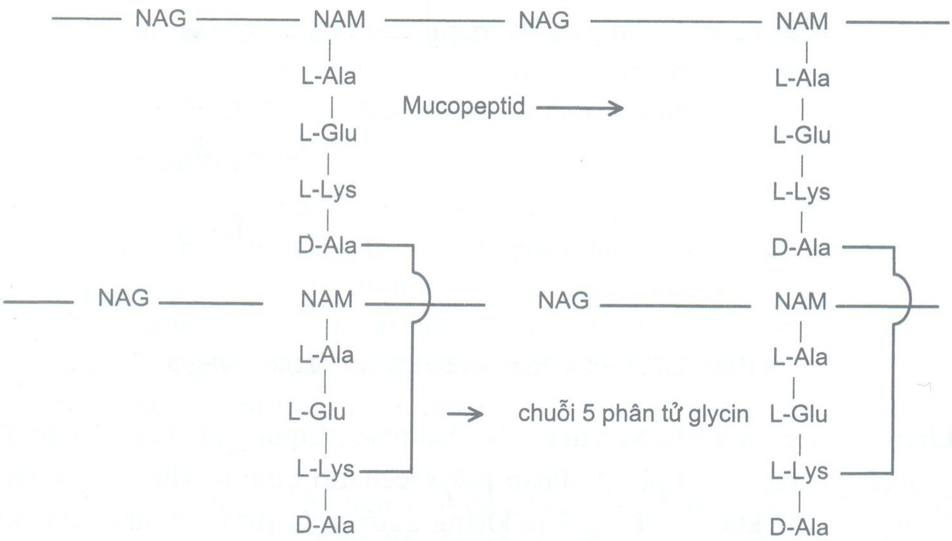
Ngoài ra, thành tế bào vi khuẩn Gram dương còn chứa *acid teichoic* (từ tiếng Hy Lạp teichos nghĩa là "thành") do Baddiley phát hiện. Đây là một cao phân tử cấu tạo bởi polyol-phosphat (thường là ribitol hoặc glycerol), gắn với lớp peptidoglycan. Ở *S. aureus*, acid teichoic có cấu trúc cao phân tử từ ribitol phosphat, trong khi ở vài loài khác lại là glycerol phosphat. Acid teichoic cấu tạo từ ribitol có cấu trúc từ CDP-ribitol (cytidin diphosphat ribitol), còn acid teichoic cấu tạo từ glycerol thì có cấu trúc từ CDP-glycerol (hình 2.5 và 2.6).

$$\left[\text{Cytidin} - P - P - \text{ribitol}\right] \xrightarrow{\text{enzym}} \left[-O-CH_2-CH2-CH2-CH2-CH_2-O-P-\right]_n + \text{nCMP}$$

Polyribitol (cytidin mono P)

Hình 2.5. Acid teichoic

Acid teichoic tích điện âm do gốc phosphat nên có thể điều hòa sự di chuyển của các cation vào, ra tế bào. Acid teichoic cũng đảm nhận một vai trò trong sự phát triển của tế bào do có vai trò điều hòa tác động của autolysin - enzym có nhiệm vụ tách các thành phần của thành tế bào với những phần của tiểu đơn vị mới được tổng hợp. Ngoài ra acid teichoic có tính kháng nguyên.

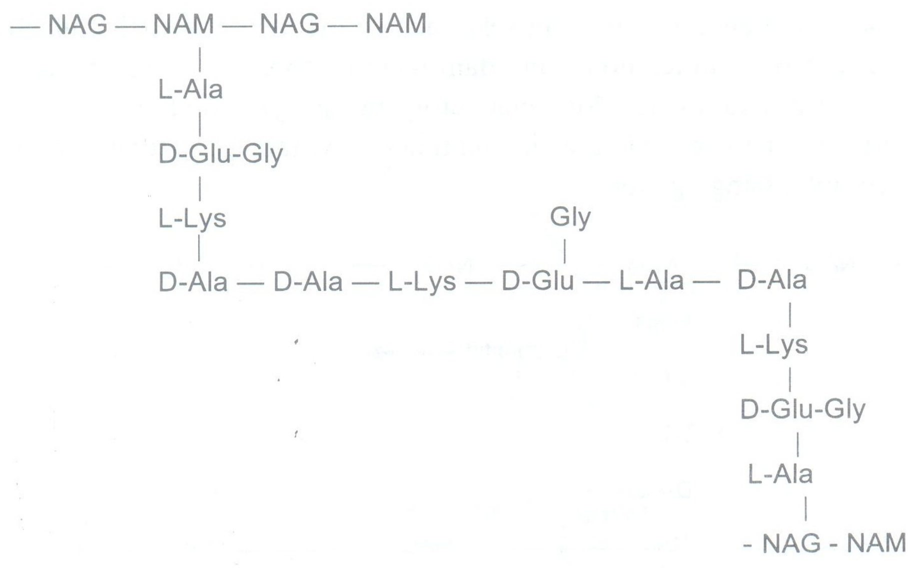


Hình 2.6. Peptidoglycan của *Staphylococcus aureus*

Thành tế bào vi khuẩn Gram âm

Khác với thành tế bào vi khuẩn Gram dương, ở vi khuẩn Gram âm, peptidoglycan chỉ là thành phần thứ yếu (chỉ dày 3nm) và không có acid teichoic, nhưng lại có lớp màng ngoài (outer membrane) và lipid chiếm tỷ lệ lớn, có thể tới 20% trọng lượng khô của màng (dưới dạng lipoprotein, phospholipid và lipopolysaccharid) (hình 2.7).

Về cấu trúc, lớp màng ngoài gồm ba lớp: hai lớp protein và lớp đôi phospholipid, trong đó khảm những protein đặc biệt. Hai thành phần quan trọng của màng ngoài là lipopolysaccharid và protein đặc biệt.



Hình 2.7. Peptidoglycan của *Micrococcus luteus*

Lipopolysaccharid (LPS) cấu tạo bởi hai phần: Lipid phức hợp còn gọi là lipid A và polysaccharid gắn vào lipid A. Phần polysaccharid có tính kháng nguyên (cấu tạo thay đổi tùy loài vi khuẩn) còn gọi là kháng nguyên O (từ tên Ohne Hauch). LPS là một loại nội độc tố rất độc đối với người và thú, độc tính nằm ở lipid A.

Protein đặc biệt gồm protein xuyên qua màng ngoài tạo những kênh nhỏ gọi là *porin* có nhiệm vụ cho một số chất thấm qua và những protein gắn màng ngoài vào lớp peptidoglycan.

Protein được phân làm ba nhóm:

- *Nhóm 1* gồm các protein ký hiệu Omp C, D, F. Các protein này tạo những kênh nhỏ cho phép sự khuếch tán tự do các phân tử thân nước có PM = 600.
- *Nhóm 2* gồm các protein ký hiệu Lam B và Tsx có ở *E. coli* và *S. typhimurium*. Chúng có tính đặc hiệu rất cao. Lam B là nơi nhận (receptor) thực khuẩn Lamda và cho phép khuếch tán qua màng các phân tử maltodextrin. Tsx là nơi nhận thực khuẩn T6 (Tsix) và cho phép các nucleosid khuếch tán qua màng.
- *Nhóm 3* gồm protein ký hiệu Omp A không có khả năng thấm (non-porin) có nhiệm vụ gắn màng ngoài vào peptidoglycan và là nơi gắn pili phái có nhiệm vụ trong sự tiếp hợp vi khuẩn F^- và F^+.

Giữa thành tế bào và màng tế bào chất có một khoảng không gian quanh tế bào chất (periplasma). Các độc tố vi khuẩn và các enzym tồn tại ở đây. Các enzym này có khả năng phá hủy kháng sinh trước khi kháng sinh đi qua màng tế bào chất.

Cấu trúc nhiều lớp của thành tế bào vi khuẩn Gram âm có khả năng bảo vệ vi khuẩn do ngăn cản các yếu tố hóa học như kháng sinh vượt qua.

Chức năng của thành tế bào vi khuẩn

Bảo vệ và giữ hình dạng tế bào vi khuẩn

Lớp peptidoglycan làm cho tế bào có tính cứng rắn, giúp giữ vững hình dạng tế bào vì áp suất bên trong tế bào có thể lớn gấp 20 lần áp suất bên ngoài do nồng độ cao của các muối vô cơ, carbohydrat, acid amin và các phân tử khác trong tế bào. Penicillin ngăn chặn sự sinh tổng hợp thành tế bào vi khuẩn *Staphylococcus aureus* đang phát triển và làm tế bào bị vỡ.

Ở vi khuẩn Gram dương, lysozym có khả năng thủy phân peptidoglycan của những vi khuẩn đã tổng hợp thành tế bào (do phân hủy mối nối giữa NAG và NAM) làm vi khuẩn Gram dương mất thành tế bào. Khi đó vi khuẩn Gram dương sẽ mất tính cứng rắn và sẽ bị vỡ nếu áp suất thẩm thấu của môi trường nhỏ hơn áp suất thẩm thấu của tế bào chất. Nhưng vi khuẩn có thể sống sót nếu để trong môi trường chứa 20% saccharose. Vi khuẩn bị mất hoàn toàn thành tế bào chỉ còn màng tế bào chất được gọi là thể nguyên sinh (*protoplast*).

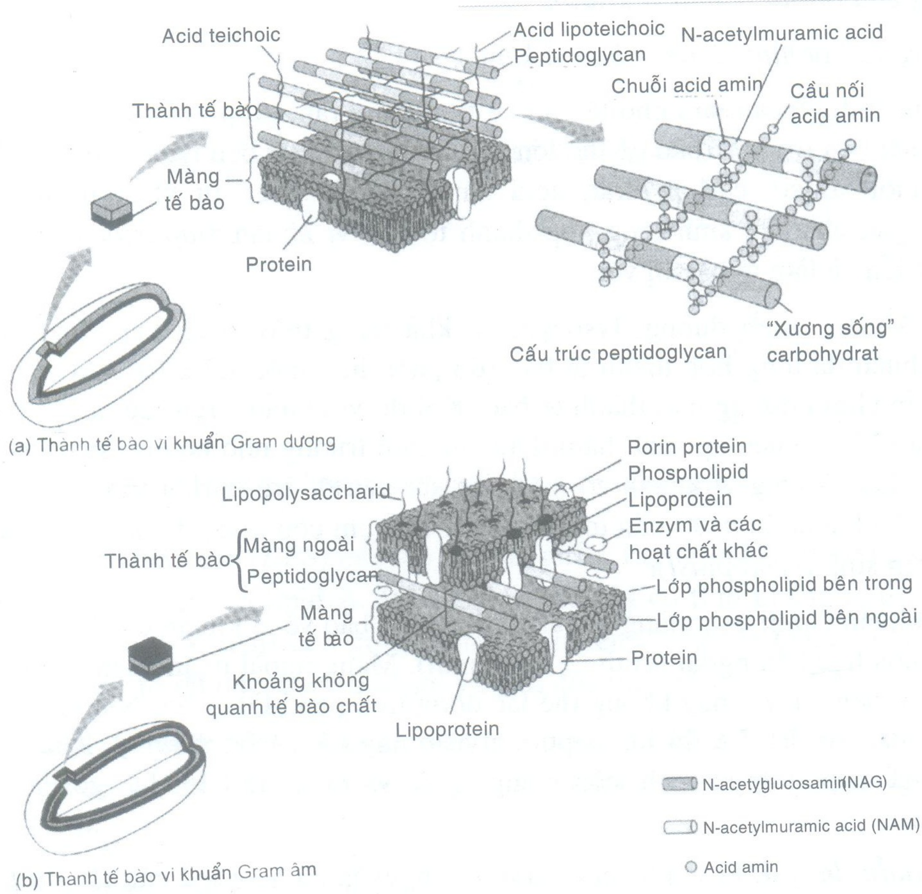
Ở vi khuẩn Gram âm, màng ngoài có tác dụng bảo vệ vi khuẩn chống lại sự thấm các yếu tố hóa học bên ngoài (ví dụ: kháng sinh). Màng ngoài ngăn chặn sự xâm nhập của lysozym, nên enzym này không thể tác động trên peptidoglycan. Nhưng nếu trước đó xử lý tế bào với EDTA thì lớp peptidoglycan này có thể bị phá hủy. Khi vi khuẩn Gram âm mất peptidoglycan chỉ còn màng ngoài và màng tế bào chất gọi là thể cầu *(spheroplast)*.

Vi khuẩn dạng L là vi khuẩn ở dạng thể nguyên sinh và thể cầu tăng trưởng và phân chia được. Dạng L có thể trở lại dạng vi khuẩn bình thường sau khi không còn chất cảm ứng. Dạng này là nguyên nhân của sự nhiễm mạn tính và không nhạy cảm với kháng sinh tác động trên thành tế bào, gây khó khăn cho trị liệu.

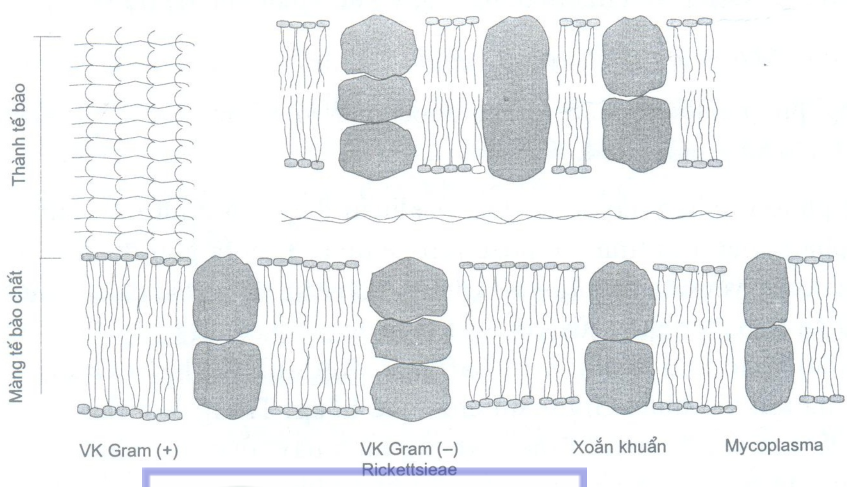
Vai trò trong sự nhuộm màu Gram

Phương pháp nhuộm màu Gram được nhà vi trùng học Đan Mạch Christian Gram hoàn thiện vào năm 1884.

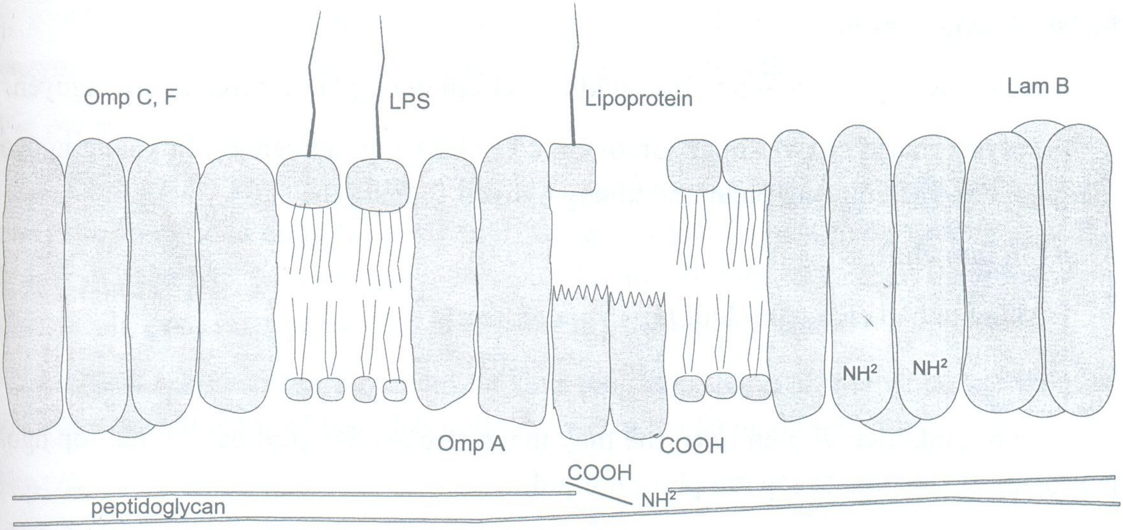
Trong phương pháp này, đầu tiên vi khuẩn được cố định trên lam bởi nhiệt rồi nhuộm với phẩm màu tím tinh thể hoặc tím gentian. Đây là giai đoạn nhuộm đơn. Sau đó mẫu được xử lý với hỗn hợp I_2 + KI (dung dịch Lugol) có tác dụng như chất cố định màu. Giai đoạn tiếp, được tẩy rửa với aceton hoặc alcol. Cuối cùng được nhuộm lại với một phẩm màu khác như fushin hoặc safranin. Kết quả vi khuẩn Gram dương sẽ cho màu tím, trong khi vi khuẩn Gram âm cho màu hồng. Trong một thời gian dài, cơ chế nhuộm màu Gram còn là một bí mật. Nhưng hiện nay, dựa vào những sự hiểu biết về cấu trúc thành tế bào vi khuẩn, có thể thấy rõ sự khác biệt về thành tế bào vi khuẩn Gram dương và Gram âm giúp giải thích cơ chế nhuộm màu này.



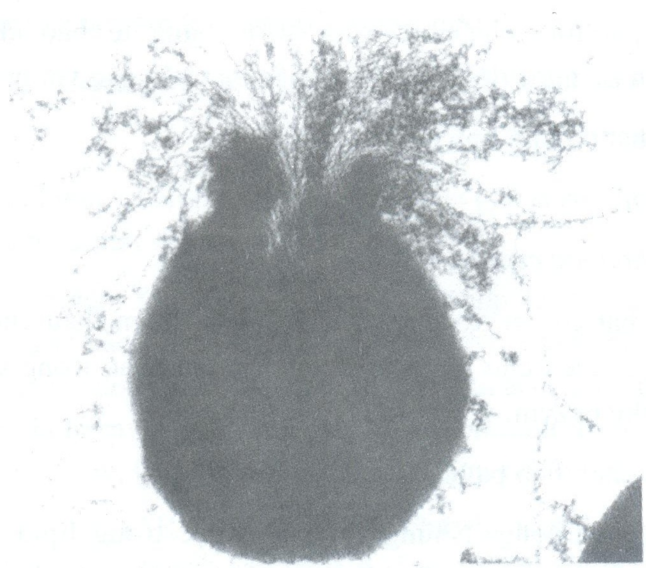
Hình 2.8. Các chi tiết cấu tạo của thành tế bào vi khuẩn



Hình 2.9. Cấu trúc khác nhau của thành tế bào ở các nhóm vi khuẩn



Hình 2.10. Cấu trúc protein màng ngoài vi khuẩn Gram âm



Hình 2.11. Ảnh chụp tế bào *Staphylococcus aureus* bị vỡ do tác động của penicillin

Sự khác biệt có thể được giải thích là: thành tế bào vi khuẩn Gram âm chứa nhiều lipid (có thể tới 20%) trong khi thành tế bào vi khuẩn Gram dương chứa rất ít lipid (1-2%). Do đó theo giả thiết của Salton, khi tẩy bằng cồn, cồn sẽ lấy lipid từ thành tế bào vi khuẩn Gram âm để lại những lỗ giúp phẩm màu tím tinh thể khuếch tán nhanh hơn trong khi ở vi khuẩn Gram dương khuếch tán chậm hơn. Kết quả là vi khuẩn Gram âm bị mất màu tím và sẽ được nhuộm lại với fushin, trong khi vi khuẩn Gram dương còn giữ màu tím.

→ hồng
→ tím

Vai trò kháng nguyên

Acid teichoic của thành tế bào vi khuẩn Gram dương là một loại kháng nguyên.

Polysaccharid của vi khuẩn Gram âm có tính kháng nguyên gọi là kháng nguyên mặt ngoài có vai trò trong phản ứng kháng nguyên - kháng thể.

Màng tế bào chất

Màng tế bào chất nằm dưới lớp thành tế bào.

Cấu trúc

Dưới kính hiển vi điện tử có thể thấy màng tế bào chất gồm ba lớp: hai lớp ngoài là protein và lớp giữa là lớp đôi phospholipid.

Protein nằm ở ngoài gọi là protein ngoại biên, protein nằm ở lớp đôi phospholipid gọi là protein nội. Protein chiếm 60% trọng lượng màng tế bào chất.

Lớp đôi phospholipid chiếm khoảng 40% màng tế bào chất. Các phân tử phospholipid có phần kỵ nước đối đầu nhau, phần ưa nước gắn với protein ngoại biên.

Màng tế bào chất có tính linh động.

Chức năng

Có tính thẩm thấu chọn lọc cao độ

Màng tế bào chất có vai trò như một lớp màng thẩm thấu chọn lọc. Nhiệm vụ hàng đầu của nó là chuyên chở những chất dinh dưỡng vào trong tế bào và đào thải những chất bài tiết như enzym, độc tố ra khỏi tế bào.

Sự hấp thu các chất theo ba hiện tượng sau:

- Sự khuếch tán tự động: Những chất tan được trong lipid của màng có thể khuếch tán ngang qua màng. Sự khuếch tán này tùy thuộc thang nồng độ.
- Sự khuếch tán dễ dàng: Do màng tế bào chất chứa nhiều hệ thống chuyên chở như hệ thống chuyên chở các ion vô cơ, đường, acid amin. Các hệ thống này có tính chuyên biệt và không phụ thuộc thang nồng độ.
- Chuyên chở chủ động: Sự chuyên chở này cần năng lượng ATP và các hệ thống chuyên chở đặc biệt. Nồng độ của chất cần chuyên chở có thể cao hơn 3 - 4 lần nồng độ bên ngoài tế bào.

Ngoài ra tính linh động của màng tế bào giải thích sự đi qua màng của một vài chất như các acid amin và các base nitơ không tan trong lipid.

Màng tế bào chất chứa những hệ thống chuyên chở electron như cytochrom, các enzym hô hấp nên có nhiệm vụ như ty thể của tế bào nhân thật.

Vai trò trong sự phân bào

Ở một số vi khuẩn, nhất là vi khuẩn Gram dương có một hay nhiều phần màng tế bào chất không đều cuộn lại trong một bao gọi là mesosom. Chúng thường xuất hiện khi có sự phân bào. Một vài loại mesosom có dạng túi, một số khác có dạng mỏng như phiến kính. Loại sau thường có ở vi khuẩn dạng thể nguyên sinh.

Ngoài ra, mesosom có nhiệm vụ sinh tổng hợp thành tế bào và có thể làm tăng diện tích bề mặt màng tế bào chất giúp cho việc gắn các hệ thống chuyên chở.

Ribosom

Cấu trúc

Ribosom nằm trong tế bào chất, cấu tạo bởi rARN (chiếm 60% ribosom và 90% ARN của vi khuẩn) và protein (chiếm 40% ribosom).

Ribosom của vi khuẩn gồm hai tiểu đơn vị 30S và 50S, khi phối hợp cho ribosom 70S.

Chức năng

Ribosom có nhiệm vụ sinh tổng hợp protein ở giai đoạn dịch mã. Quá trình sinh tổng hợp protein gồm 3 giai đoạn:

- *Giai đoạn khởi đầu*: Khi chưa có sự sinh tổng hợp, hai tiểu đơn vị 30S và 50S nằm riêng rẽ trong tế bào chất. Bắt đầu sinh tổng hợp, 30S sẽ gắn vào mARN ở codon khởi đầu là mã codon AUG. Sau đó tARN sẽ gắn acid amin đầu tiên tương ứng với codon AUG là formylmethionin (-NH_2 của methionin bị formyl hóa) tại vị trí P. Cuối giai đoạn này, tiểu đơn vị 50S sẽ phối hợp với 30S thành ribosom 70S.
- *Giai đoạn kéo dài*: tARN thứ hai sẽ vận chuyển acid amin tương ứng với codon thứ hai trên mARN và gắn vào vị trí A. Sau đó liên kết peptid sẽ được thành lập giữa nhóm -COOH của formyl methionin và nhóm -NH_2 của acid amin mới (được xúc tác bởi enzym peptidyl transferase), tiếp đó tARN thứ nhất sẽ rời vị trí P và tARN thứ hai hoán vị từ vị trí A sang vị trí P.
- *Giai đoạn kết thúc*: Quá trình sự sinh tổng hợp diễn ra liên tục như trên bằng cách gắn từng acid amin vào dây peptid và sẽ kết thúc khi ribosom gặp bộ ba kết thúc, (Quá trình có thể là một trong các codon UAA, UAG, UGA (không tương ứng với acid amin nào). Nhờ yếu tố R (release factor), tARN sẽ hoán vị lần cuối và tách khỏi dây peptid. Sau đó 30S, 50S và dây peptid cùng mARN được phóng thích ra tế bào chất.

Trên một mARN có thể có nhiều ribosom cùng tổng hợp protein gọi là polysom.

Sự liên quan giữa cấu trúc và chức năng

Cấu trúc rARN:

Tiểu đơn vị 50S gồm hai dây 23S và 5S. Dây 23S gồm khoảng 2904 nucleotid, đây là ARN cơ cấu. Dây 5S gồm khoảng 120 nucleotid có nhiệm vụ gắn tARN vào vị trí A.

Tiểu đơn vị 30S có một dây 16S gồm khoảng 1500 nucleotid. Ở vi khuẩn đề kháng kanamycin, sợi 16S có adenin đầu bị metyl hóa ở C_3. Ở vi khuẩn nhạy cảm, adenin này là dimetyl.

Cấu trúc protein:

Tiểu đơn vị 50S có 34 protein ký hiệu L1 đến L34.

Tiểu đơn vị 30S có 21 protein ký hiệu S1 đến S21. S1 có nhiệm vụ gắn mARN vào ribisom; S6 gắn formyl methionin; S2, S3, S4 có nhiệm vụ gắn aminocyl tARN; S12 có vai trò trong sự đề kháng streptomycin.

Thể nhân

Nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn nằm trong tế bào chất, không có màng nhân bao quanh. Do vậy vi khuẩn không có nhân chuẩn như tế bào nhân thật. Thuật ngữ thể nhân để chỉ vùng tế bào chất chứa nhiễm sắc thể.

Nhiễm sắc thể đơn bội chỉ gồm một phân tử ADN có dạng vòng, không liên kết với protein như ở tế bào nhân thật.

ADN có trọng lượng phân tử khoảng 3×10^9 dalton.

Mặc dù nhân đơn sơ nhưng vẫn chứa đầy đủ yếu tố và nhiệm vụ như nhân của sinh vật nhân thật.

2.2. Những bộ phận không bắt buộc

Nang và glycocalix

Nang

Nang bao ở phía ngoài vi khuẩn, có cấu trúc đậm đặc như một bao. Nang có bản chất là polysaccharid hoặc protein. Nang có ở nhiều loại trực khuẩn, cầu khuẩn nhưng không có ở xoắn khuẩn.

Nang có tác dụng bảo vệ vi khuẩn. Với thành phần nước cao, nang chống lại sự loại nước và ngăn cản những chất dinh dưỡng đi theo con đường này. Trong cơ thể nó chống lại sự thực bào. Vi khuẩn gây bệnh có nang là vi khuẩn độc. Ví dụ: *Pneumococcus pneumoniae* mất nang sẽ vô hại.

Glycocalix

Glycocalix có bản chất hóa học giống như nang, nhưng lớp chất tiết ở dạng lỏng lẻo gắn ít với tế bào. Nó thường cấu trúc bởi những sợi như mạng lưới, giúp vi khuẩn gắn vào bề mặt của tế bào vật chủ. Ví dụ: *Streptococcus mutans* có glycocalix cấu tạo bởi dextran (tổng hợp từ saccharose), là nguyên nhân gây sâu răng ở người.

Tiêm mao

Tiêm mao là những sợi rất nhỏ, dài từ 3 -12 µm, mảnh mai (d = 0,01 - 0,03 µm) chỉ thấy được ở kính hiển vi thường bằng phương pháp nhuộm đặc biệt. Có vai trò trong sự di động của vi khuẩn và có tính kháng nguyên gọi là kháng nguyên H.

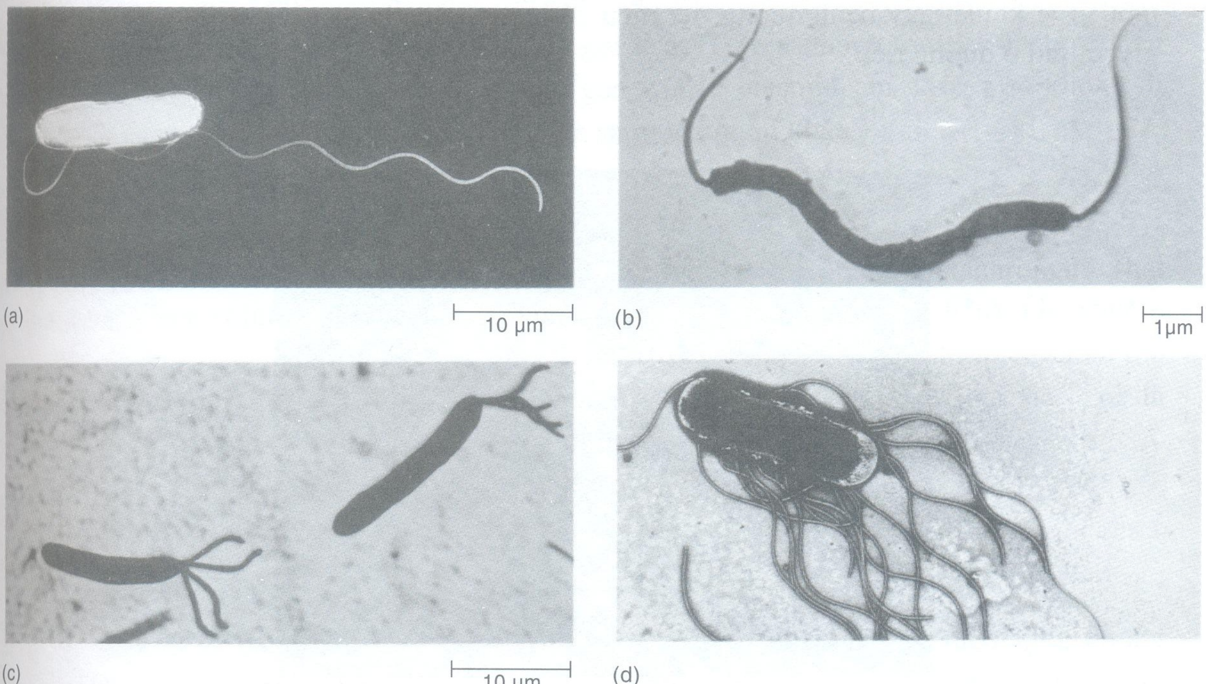
Tiêm mao cấu tạo bởi một protein sợi gọi là flagellin có tính đàn hồi như myosin của cơ. Tiêm mao bắt đầu hình thành từ một tiểu thể trong tế bào chất.

Sự phân bố của tiêm mao là một đặc điểm có thể dùng để phân loại (xem thêm hình 2.12):

– Tiêm mao ở đầu: đơn mao (monotrichous) và đa mao chùm (lophotrichous).

– Tiêm mao ở hai đầu: lưỡng mao (amphitrichous).

– Tiêm mao bao xung quanh vi khuẩn: chu mao (peritrichous)



Hình 2.12. Các loại tiêm mao ở vi khuẩn

a. Đơn mao; b. Lưỡng mao; c. Đa mao chùm; d. Chu mao

Pili

Pili là những sợi ngắn hơn và nhỏ hơn tiêm mao, không có nhiệm vụ trong sự di động của vi khuẩn. Pili đầu tiên được tìn thấy ở vi khuẩn Gram âm (*Neisseria gonorrhoeae*).

Có hai loại pili:

Pili phái

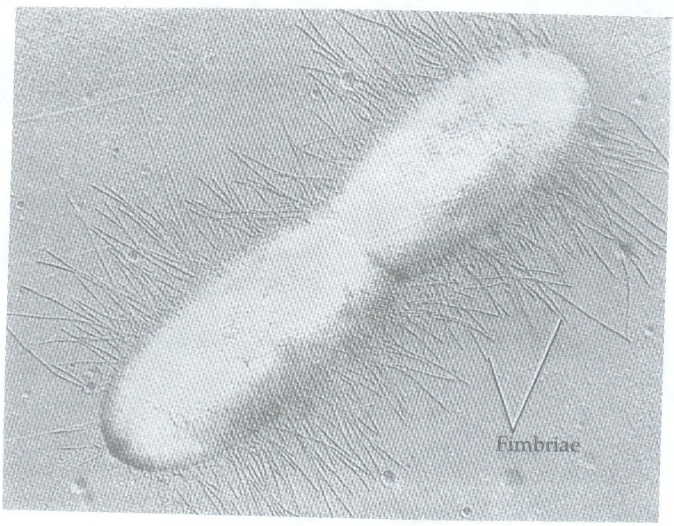
Pili phái hiện diện ở những vi khuẩn có yếu tố phái (phái F^+), vi khuẩn không chứa yếu tố phái là vi khuẩn phái F^-. Pili phái được thành lập bởi yếu tố phái F trong tế bào chất, có nhiệm vụ tạo sự tiếp hợp giữa vi khuẩn phái F^+ và vi khuẩn phái F^- để có sự di chuyển gen.

Số lượng pili phái thường ít (*E. coli* có 4 pili phái).

Pili thường

Pili thường ngắn hơn pili phái nhưng có đường kính lớn hơn. Pili thường có số lượng nhiều hơn pili phái (ví dụ: *E. coli* có khoảng 100 pili thường) (hình 2.13).

Người ta tìm thấy trong cấu trúc của pili có một loại protein gọi là lectin. Pili thường có nhiệm vụ trong sự bám dính của vi khuẩn vào tế bào chủ. Sự dính vào của pili có tính chuyên biệt. Tính chất này do lectin có khả năng gắn chuyên biệt với một loại đường có trong cấu trúc glycolipid, glycoprotein ở màng tế bào vật chủ. Ví dụ, một số vi khuẩn gây bệnh đường tiết niệu có lectin gắn chuyên biệt với galactose của glycolipid ở đường tiểu.



Hình 2.13. Pili ở vi khuẩn *E.coli*

Plasmid

Plasmid là phân tử ADN nằm ngoài thể nhân vi khuẩn và có thể sát nhập vào thể nhân vi khuẩn. Plasmid có thể tự sao chép độc lập trong tế bào. Plasmid được dùng như vectơ chuyên chở gen trong công nghệ gen.

Có nhiều loại plasmid. Một số loại chính là:

Plasmid F (Yếu tố phái F)

Yếu tố phái đã được tìm thấy ở *E. coli* K12. Sự hiện diện của plasmid này quyết định yếu tố phái của vi khuẩn (vi khuẩn phái đực F^+). Plasmid này chứa khoảng 20 gen và nó quyết định sự thành lập pili phái có nhiệm vụ trong sự trong sự di chuyển gen giữa vi khuẩn F^+ và vi khuẩn F^-. Một số vi khuẩn có khả năng tái tổ hợp cao gọi là Hfr (high frequency of recombination). Ở những vi khuẩn này, plasmid phái như là một phần của nhiễm sắc thể.

Plasmid R (Yếu tố đề kháng)

Yếu tố này chứa những gen giúp vi khuẩn chống lại nhiều tác nhân kháng khuẩn như kháng sinh, được các nhà khoa học Nhật Bản tìm ra đầu tiên năm 1959.

Yếu tố R có khả năng di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác, nhưng cũng có loại không di chuyển được. Mỗi plasmid có thể mang những gen đề kháng với nhiều loại kháng sinh (chloramphenicol, tetracyclin, streptomycin, sulfamid ...). Gen có trách nhiệm trong sự di chuyển yếu tố R gọi là RTF (resistance transfer factor). Gen có trách nhiệm tạo tính đề kháng gọi là gen r. Các plasmid chỉ chứa r sẽ không di chuyển được, plasmid có RTF sẽ di chuyển sang vi khuẩn khác.

2.3. Cấu trúc hạt

Trong tế bào chất vi khuẩn còn chứa những hạt đặc biệt như metachromatic (hạt biến sắc) hay volutin cấu tạo bởi polyphosphat (có ở vi khuẩn bạch hầu), khi nhuộm với xanh metylen sẽ bắt màu đậm hơn. Ngoài ra còn có hạt lưu huỳnh, những tinh thể protein có tính độc với côn trùng. Người ta còn tìm thấy một loại hạt gọi là magnetosome (hạt từ tính) giúp vi khuẩn định hướng trong môi trường.

2.4. Bào tử

Cấu trúc

Bào tử là dạng cấu tạo đặc biệt giúp vi khuẩn chống những điều kiện không thuận lợi của môi trường (nhiệt độ cao, lạnh, khô, ánh sáng ...), có ở một số vi khuẩn Gram dương.

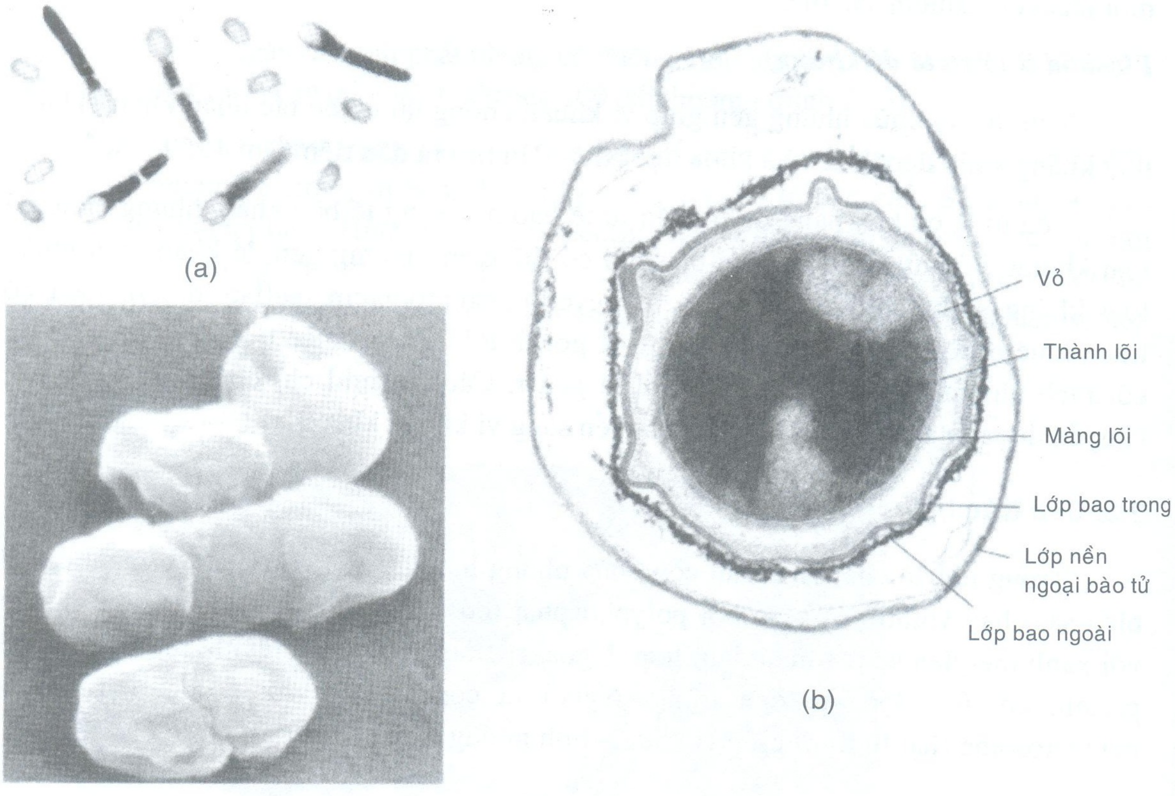
Vỏ bào tử được bọc bởi hai lớp bao chứa nhiều protein có thành phần cystein cao giống như keratin. Chính hai lớp này che chở cho bào tử (Hình 2.14).

Dưới lớp vỏ có màng bào tử chất (gồm thành lõi và màng lõi) sẽ cho ra màng tế bào chất và thành tế bào vi khuẩn khi bào tử phát triển thành tế bào sinh dưỡng.

Nguyên sinh chất của bào tử chứa nước và tất cả các enzym cần thiết cho vi khuẩn nhưng với lượng thấp, đặc biệt chứa acid dipicolinic.

Nhiệm vụ của bào tử

Cấu tạo của hai lớp bao có tính kháng thẩm thấu cao độ, giúp giải thích sự đề kháng cao của bào tử với các tác nhân ngoại cảnh khắc nghiệt. Muốn diệt bào tử cần các điều kiện nhiệt độ cao (120°C trong 20 phút đối với nhiệt ẩm hay 165°C trong 2 giờ đối với nhiệt khô). Nội bào tử là hình thức duy trì loài của vi khuẩn.



Hình 2.14. Bào tử vi khuẩn

(a) Bào tử hình thành ở đầu tế bào *Clostridium* làm cho tế bào có hình dùi trống nhìn qua kính hiển vi quang học.

(b) Cấu trúc chi tiết của bào tử *Bacillus thuringiensis* nhìn dưới kính hiển vi điện tử xuyên thấu.

(c) Hình chụp dưới kính hiển vi điện tử của các bào tử đang nẩy mầm (x 30. 000)

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Cấu trúc nào của peptidoglycan có thể bị thủy phân bởi lysozym:

   a. Dây glycan
   b. Cầu peptid
   c. Mucopeptid
   d. b và c

2. Vi khuẩn có khả năng bám vào tế bào vật chủ nhờ:

   a. Pili
   b. Glycocalix
   c. Lớp màng nhày
   d. Protein
   e. Tất cả

3. Nội bào tử của vi khuẩn là:

   a. Một phần của tế bào mẹ, có cùng cơ cấu di truyền với tế bào mẹ
   b. Một cấu trúc tế bào đặc biệt nằm trong tế bào mẹ
   c. Một hình thức sinh sản duy trì loài
   d. Một dạng tế bào được hình thành khi vi khuẩn gặp điều kiện bất lợi
   e. Tất cả

4. Khi nhuộm *C. diphteria* bằng xanh methylen sẽ thấy rõ những tiểu hạt, là:

   a. Hạt dự trữ
   b. Hạt từ tính
   c. Hạt biến sắc
   d. Hạt lipid

5. Sự dính của vi khuẩn vào tế bào vật chủ là nhờ pili có:

   a. Đường đặc hiệu
   b. Protein đặc hiệu
   c. Lipid đặc hiệu
   d. Tất cả

6. Vi khuẩn nào có glycocalix:

   a. *Klebsiella pneumoniae*
   b. *Bacillus anthracis*
   c. *Streptococcus pneumoniae*
   d. *Streptococcus mutans*

7. Vi khuẩn Gram (-) có khả năng đề kháng với nhiều loại kháng sinh do:

   a. Thành tế bào có nhiều lớp
   b. Có lớp màng ngoài
   c. Pili
   d. a và c đúng

8. Cephalosporin có thể đi vào tế bào vi khuẩn qua:

   a. Porin
   b. Peptidoglycan
   c. Màng ngoài
   d. a và b đúng

9. Kháng sinh nào ngăn cản sự tạo chuỗi peptid ngay từ acid amin thứ 2:

a. Chloramphenicol
b. Erythromycin
c. Tetracyclin
d. Lincomycin

10. Đặc điểm nào quan trọng nhất giúp cho sự phân loại vi khuẩn Gram (-):

a. Cách xắp xếp của tế bào
b. Cách sắp xếp của tiêm mao
c. Phản ứng sinh hóa
d. Phản ứng huyết thanh học

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. I. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
2. G.J Tortora, B.R Funke, C.L Case. ***Microbiology – An Introduction***. 6th edition, 1992. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bài 3

DINH DƯỠNG VÀ TĂNG TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN

MỤC TIÊU

1. *Xác định được các nhu cầu dinh dưỡng và yếu tố tăng trưởng của vi khuẩn.*
2. *Trình bày được cách tăng trưởng, biểu đồ tăng trưởng của vi khuẩn và các phương pháp đo sự tăng trưởng.*
3. *Nêu được các yếu tố môi trường chính ảnh hưởng đến sự tăng trưởng dân số và phân biệt được các nhóm vi sinh vật theo nhiệt độ, pH và oxy.*
4. *Biết được cách kiểm soát sự tăng trưởng của vi khuẩn.*
5. *Nắm được các ứng dụng trong nghiên cứu, chẩn đoán, công nghệ vi sinh.*

1. DINH DƯỠNG VI KHUẨN

Vi khuẩn chủ yếu lấy các chất dinh dưỡng từ môi trường xung quanh. Các môi trường nuôi dưỡng nhân tạo cần cung cấp đầy đủ năng lượng, các vật liệu xây dựng tế bào, cụ thể phải đáp ứng các yếu tố sau:

- Có các chất dinh dưỡng thích hợp và các nguyên tố khác cần thiết để tạo nguyên sinh chất, bao gồm có các nguồn thức ăn carbon, nitơ, chất khoáng, các nguyên tố khác.
- Có môi trường thông khí thích hợp, là không khí bình thường hay gia tăng carbonic hoặc đuổi hết khí oxy.
- pH môi trường thích ứng.
- Độ ẩm đủ.
- Điều kiện nuôi cấy thích hợp.

1.1. Nhu cầu dinh dưỡng

Nhu cầu năng lượng

Môi trường phải chứa những chất cần thiết để vi khuẩn chuyển hóa, tạo năng lượng cần thiết cho vi khuẩn tổng hợp chất sống và di động. Ba nguồn năng lượng được vi khuẩn sử dụng là ánh sáng, chất vô cơ và chất hữu cơ.

Năng lượng sẽ được tạo ra qua một trong ba cơ chế: lên men trong vi khuẩn kỵ khí, hô hấp trong vi khuẩn hiếu khí, quang hợp trong vi khuẩn quang tổng hợp. Một điểm chung là năng lượng quang hợp hay năng lượng hóa học đều được biến thành ATP, một chất giàu năng lượng, sử dụng được bởi tất cả tế bào theo những hệ thống giống như ở sinh vật bậc cao.

Các chất được vi sinh vật dùng để tạo ATP gồm chất hữu cơ, các acid amin, hydrat carbon, chất vô cơ như CO_2, SO_4^{2-}, NO_3^-, H_2S.

Chất dinh dưỡng

Chất dinh dưỡng có thể là *thiết yếu* (nếu không có thì tế bào không tăng trưởng được) và có thể là *có ích* nhưng không phụ thuộc (nếu có thì được vi khuẩn sử dụng nhưng không bắt buộc). Tùy lượng chất được đòi hỏi với lượng lớn hay nhỏ ta có hai nhóm là chất dinh dưỡng lượng lớn và vi lượng.

Chất dinh dưỡng đa lượng

Carbon có trong hầu hết các thành phần của tế bào và trong các sản phẩm trao đổi chất. Khoảng một nửa chất khô của tế bào là carbon. Chính vì vậy, những hợp chất chứa carbon có ý nghĩa hàng đầu trong sự sống của vi sinh vật.

Nguồn carbon cho vi sinh vật rất phong phú. Ngoài những dạng carbon vô cơ thuần khiết (kim cương, than chì) ra hầu như không có hợp chất carbon nào mà không được một nhóm vi sinh vật nhất định sử dụng.

Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ của các nguồn carbon phụ thuộc vào:

- Thành phần và cấu tạo hóa học của nguồn carbon, đặc biệt là mức độ oxy hóa của các nguyên tử carbon.
- Đặc điểm sinh lý của vi sinh vật: với các hợp chất có phân tử thấp, như một số đường chẳng hạn thì vi sinh vật có thể đồng hóa trực tiếp. Các hợp chất hữu cơ cao phân tử (tinh bột, protein …) sẽ được thủy phân nhờ các enzym thành các hợp chất phân tử thấp mà vi sinh vật có thể đồng hóa được. Đối với những hợp chất không tan trong nước (cellulose, lipid, parafin) thì vi sinh vật hấp thụ quanh bề mặt của chúng và phân giải chúng dần dần.

Đối với vi sinh vật quang tổng hợp thì nguồn carbon duy nhất là CO_2, đối với vi sinh vật khác thì nguồn carbon có thể là carbohydrat, acid amin, acid béo, acid hữu cơ, các base nitơ, hợp chất thơm và vô số các hợp chất hữu cơ khác.

Nguồn carbon chủ yếu của vi sinh vật là carbohydrat và thường là glucose, lactose, tinh bột.

Phân loại vi sinh vật theo nguồn năng lượng và carbon được tóm tắt trong bảng 3.1.

Nitơ là nguyên tố nhiều thứ hai trong tế bào, là thành phần chính của protein, acid nucleic. Nitơ cũng hiện diện trong polysaccharid, peptidoglycan. Tỉ lệ nitơ chứa trong chất khô của tế bào vi sinh vật là 12 - 15%. Quá trình chuyển hóa carbon và nitơ tạo các acid amin, là nguyên liệu để tổng hợp các phân tử protein.

Nitơ trong thiên nhiên ở hai dạng vô cơ và hữu cơ. Vì là thành phần chính của acid amin và base nitơ nên nitơ có sẵn ở các dạng này từ sinh vật chết phân hủy và khoáng hóa. Nitơ có rất nhiều trong không khí, song đây chỉ là nguồn nitơ đối với một số vi sinh vật gọi là các vi sinh vật cố định nitơ (*Cyanobacteria, Rhizobium, Azotobacter*).

Bảng 3.1. *Các nhóm dinh dưỡng khác nhau của vi sinh vật*

Nguồn năng lượng	**Từ dùng**	**Nguồn carbon**	**Vi sinh vật (theo nguồn năng lượng và carbon)**
Ánh sáng	Phototroph	Carbonic	Quang tự dưỡng (Photoautotroph)
		Hữu cơ	Quang dị dưỡng (Photoheterotroph)
Chất hóa học	Chemotroph		
Chất vô cơ	Lithotroph	Carbonic	Hóa vô cơ tự dưỡng (Chemolithoautotroph)
		Hữu cơ	Hóa vô cơ dị dưỡng (Lithotrophic heterotroph, mixotroph)
Chất hữu cơ	Chemo-organotroph	Carbonic	Dị dưỡng (Heterotroph C-autotroph)
		Hữu cơ	Dị dưỡng (Heterotroph)

Tất cả các môi trường nuôi cấy đều cần phải có chứa các loại hợp chất nitơ mà vi sinh vật có thể đồng hóa được. Các nguồn nitơ thường được người ta dùng là các hợp chất nitơ hữu cơ như pepton, nước thịt, cao ngô, bột đậu tương... và vô cơ như muối nitrit (cho vi khuẩn *Nitrobacter, Nitrosomonas*), muối nitrat (cho phần lớn vi khuẩn).

Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp của vi sinh vật không những chỉ phụ thuộc vào chính bản thân nguồn nitơ mà còn phụ thuộc vào tỉ lệ C:N trong môi trường. Tỉ lệ này có nhiều ý nghĩa. Nó tạo cho vi sinh vật khả năng trao đổi chất thích hợp, khả năng tích tụ cao các sản phẩm sinh tổng hợp và tạo thành các hệ enzym để tiến hành các phản ứng hóa sinh theo hướng có lợi.

Phospho cần cho tổng hợp ADN và ARN, ATP, phospholipid.... Phospho có trong thiên nhiên ở dạng vô cơ và hữu cơ. Vi sinh vật luôn thu nhận phospho dưới dạng muối vô cơ phosphat, thường dùng KH_2PO_4. Tuy nhiên phosphat hữu cơ thường có trong thiên nhiên và được các enzym phosphatase thủy phân, giải phóng phosphat vô cơ tự do.

Lưu huỳnh là nhu cầu thiết yếu của vi sinh vật, vì có trong acid amin (cystein và methionin) và có trong một số vitamin (thiamin, biotin, acid lipoic). Có thể cung cấp lưu huỳnh dưới dạng hữu cơ hay vô cơ như sulfat (SO_4^{2-}) hoặc sulfit (HS^-). Thường dùng $MgSO_4$. $7H_2O$.

Kali là nhu cầu phổ biến. Nhiều enzym liên quan đến sinh tổng hợp protein được hoạt hóa bởi kali. Thường dùng K_2HPO_4.

Manesi có chức năng ổn định các ribosom, có trong màng tế bào và cũng cần cho hoạt động của nhiều enzym, đặc biệt là enzym liên quan đến vận chuyển phosphat. Do đó vi sinh vật cần lượng lớn magnesi để tăng trưởng. Thường dùng $MgSO_4$. $7H_2O$, $MgCl_2$.

Calci không phải là thiết yếu cho sự tăng trưởng của nhiều vi sinh vật. Đôi khi canxi có trong thành tế bào và đóng vai trò mấu chốt trong sự ổn định với nhiệt của nội bào tử vi khuẩn. Mặc dù calci và magnesi nằm gần nhau trong bảng hệ thống tuần hoàn, nhưng calci hầu như không thay thế các nhiệm vụ của magnesi trong tế bào. Thường dùng $CaCl_2$.

Natri cần cho một số vi sinh vật. Thường dùng NaCl.

Sắt cũng cần nhiều cho vi sinh vật. Sắt được tìm thấy ở nhiều enzym trong tế bào, đặc biệt các enzym liên quan đến hô hấp. Thường dùng $FeCl_3$, $FeSO_4$.

Chất dinh dưỡng vi lượng (nguyên tố vết)

Mặc dù chỉ được cần với lượng nhỏ, chất dinh dưỡng vi lượng không thể thiếu vì quan trọng đối với toàn bộ sự dinh dưỡng của vi sinh vật như chất dinh dưỡng lượng lớn.

Cobalt cần để tạo vitamin B_{12}, nếu thêm vitamin này vào môi trường thì cobalt không còn cần nữa; cũng cần cho enzym transcarboxylase của vi khuẩn lên men acid propionic.

Kẽm có trong nhiều enzym như carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, ADN polymerase, ARN polymerase và nhiều protein gắn ADN.

Molypben có trong một số enzym molybdoflavoprotein tham gia khử nitrat hấp thu. Nó cũng có trong nitrogenase tham gia khử N_2.

Đồng có trong một số enzym tham gia hô hấp ví dụ cytochrom *c*; hoặc một số enzym tham gia quang hợp, ví dụ plastocyanin và một số superoxid dismutase.

Mangan làm hoạt hóa nhiều enzym; có trong một số superoxid dismutase là các enzym rất quan trọng để khử độc các dạng độc của oxy.

Nickel có trong các enzym hydrogenase có chức năng nhận hoặc phóng thích H_2.

Tungsteng và ***selen*** cần cho các vi khuẩn có khả năng định dạng chuyển hóa. Selen là thành phần của enzym dehydrogenase.

Yếu tố tăng trưởng

Yếu tố tăng trưởng là hợp chất hữu cơ cần một lượng rất nhỏ, thiết yếu cho sự tăng trưởng của vi khuẩn, nhưng tế bào vi khuẩn không có khả năng tổng hợp được.

Mỗi loại vi khuẩn khác nhau cần những yếu tố tăng trưởng khác nhau, đó là do khả năng tổng hợp khác nhau của tế bào vi khuẩn. Một số vi khuẩn không cần yếu tố tăng trưởng, trong khi một số khác (ví dụ *Lactobacillus*) do bị đột biến cần rất nhiều, có thể tới 30-40 chất cần thiết trong môi trường nuôi cấy chúng.

Các chất thường dùng như yếu tố tăng trưởng là vitamin, acid amin, purin, pyrimidin. Nếu dùng môi trường nuôi cấy chứa các nguyên liệu hữu cơ phức tạp như cao men, pepton thì đa số hoặc tất cả yếu tố tăng trưởng đã được cung cấp sẵn. Nhưng nếu dùng môi trường tổng hợp thì cần phải cung cấp các yếu tố tăng trưởng thường rất quan trọng.

Vitamin cần với lượng nhỏ và tham gia vào quá trình tạo nguồn năng lượng hoặc xây dựng các đại phân tử. Đa số vitamin có chức năng là coenzym. Nhiều vi sinh vật có thể tổng hợp tất cả vitamin, nhưng một số vi sinh vật cần được cung cấp sẵn trong môi trường. Vi khuẩn lactic bao gồm các chi Streptococcus và Lactobacillus được biết có nhu cầu vitamin phức tạp, thậm chí hơn cả người. Các vitamin thường được vi sinh vật cần là vitamin B_1, biotin, vitamin B_6, vitamin B_{12}.

Acid amin là thành phần của protein và phải được tổng hợp bởi vi sinh vật hoặc lấy từ môi trường. Có 20 loại acid amin khác nhau cấu tạo protein, tất cả phải có sẵn cho tăng trưởng tế bào. Nhiều vi sinh vật đòi hỏi các acid amin chuyên biệt.

Acid amin thường được cung cấp ở dạng acid amin tổng hợp hóa học trong môi trường nuôi cấy. Nếu dùng nguyên liệu phức tạp như cao thịt, thường có sẵn tất cả 20 acid amin ở dạng tự do hoặc peptid ngắn hoặc protein.

Purin và pyrimidin là thành phần cần thiết để tổng hợp acid nucleic, cũng có trong một số coenzym. Chúng có thể được cung cấp trong môi trường ở dạng base nitơ tự do hoặc dạng nucleosid.

1.2. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Dựa vào thành phần, môi trường nuôi cấy được chia thành hai nhóm: môi trường tổng hợp và môi trường tự nhiên.

Môi trường tổng hợp là môi trường có chứa tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết ở dạng hóa học tinh khiết, do đó có thành phần hóa học xác định, được dùng trong một số nghiên cứu vi sinh vật. Các môi trường tổng hợp cho vi khuẩn dị dưỡng thường khó làm và đắt tiền.

Môi trường tự nhiên (môi trường hỗn hợp) là môi trường có chứa các thành phần cần thiết nhưng không xác định thành phần hóa học; gồm hỗn hợp các sản phẩm hữu cơ từ thực vật, động vật, nấm men với các muối thích hợp cần cho sự phát triển của vi khuẩn. Thường dùng cao mạch nha, mô động vật sống, cao men, cao thịt, casein, protein đậu nành…. Ngày nay phần lớn các môi trường nuôi cấy được các hãng sản xuất sẵn và cung cấp cho các phòng thí nghiệm ở dạng khô, khi sử dụng chỉ cần thêm nước đạt thể tích, tiệt trùng trong nồi hấp rồi phân phối vào dụng cụ thích hợp.

Dựa vào mục đích sử dụng, môi trường được phân loại rất phong phú. Có thể nêu một số ví dụ môi trường trong xét nghiệm vi khuẩn như sau.

Môi trường cơ bản (môi trường dinh dưỡng) gồm đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết thích hợp cho đa số vi khuẩn tăng trưởng. Môi trường dinh dưỡng chứa pepton và cao thịt hoặc pepton và nước thịt, với 5% natri clorua.

Môi trường lỏng (canh thang) được điều chế bằng hòa tan các chất dinh dưỡng trong nước. Môi trường dinh dưỡng đặc là môi trường dinh dưỡng lỏng thêm chất làm đặc môi trường ví dụ như 1 - 2% thạch, silicagel.

Môi trường chuyên chở chứa rất ít chất dinh dưỡng (chỉ có muối đệm) đủ để vi khuẩn sống nhưng không phát triển, dùng để chuyên chở mẫu và bệnh phẩm. Môi trường thường dùng là Cary -Blair.

Môi trường phong phú (môi trường tăng sinh) là môi trường cơ bản thường được pha thêm máu, huyết thanh, dịch nấm men, acid amin hoặc các hỗn hợp chất dinh dưỡng khác để sơ bộ phân lập và nuôi cấy các vi khuẩn "kén ăn" (thường là tác nhân gây bệnh). Ví dụ môi trường thạch máu để phân lập Streptococci gây bệnh đau họng và sốt phát ban; thạch chocolat để kích thích tăng trưởng của Neisseria.

Môi trường chọn lọc là môi trường ngoài những chất dinh dưỡng cần thiết còn chứa chất ngăn chặn sự tăng trưởng của hầu hết các loại vi khuẩn trừ loại muốn khảo sát. Dựa theo thành phần ức chế có trong môi trường nhiều hay ít mà người ta phân biệt thành môi trường chọn lọc ít (ví dụ EMB), chọn lọc vừa (ví dụ SS) và chọn lọc nhiều (ví dụ BSA). EMB (Eosin Methylene Blue agar) có chứa đường lên men bởi *Escherichia coli* và các vi khuẩn Gram âm khác, nhưng cũng chứa eosin và xanh methylen là hai chất nhuộm ức chế các vi khuẩn Gram dương. SS (Salmonella và Shigella) có chứa muối mật, brilliant green ức chế các vi khuẩn Gram dương và *E. coli*, giúp cho Salmonella và Shigella mọc dễ.

Môi trường chứa kháng sinh cũng có thể được dùng trong phân lập chọn lọc. Ví dụ thạch Bordet - Gengou có 1UI penicillin /1ml môi trường, kháng sinh sẽ giới hạn sự phát triển của vi khuẩn Gram dương đường họng và có thể phân lập *Hemophilus pertusis*.

Môi trường phân biệt là môi trường có đặc tính làm cho khuẩn lạc vi khuẩn muốn cấy xuất hiện với một hình thức riêng biệt giúp ta xác định được loại vi khuẩn đó, bằng cách thêm các tác nhân đặc biệt vào môi trường để thúc đẩy hoặc ngăn chặn sự phát triển vi khuẩn đó. Ví dụ thạch MC (Mac Conkey) có chứa chất nhuộm đỏ trung tính, tím tinh thể, đường lactose. Các vi khuẩn lên men đường lactose cho các khuẩn lạc đỏ, các vi khuẩn khác cho khuẩn lạc không màu. Ngoài ra thạch MC chứa muối mật ức chế sự tăng trưởng vi khuẩn Gram dương nên môi trường này vừa là chọn lọc vừa là phân biệt.

Môi trường xác định tính chất sinh hóa là môi trường dùng để phát hiện hoạt tính enzym của vi khuẩn thuần chủng. Ví dụ như môi trường urea để thử khả năng phân giải urê thành amoni và CO_2, các môi trường chứa một loại đường để thử khả năng lên men các carbohydrat khác nhau thành acid và khí.

Ngoài ra, một số vi khuẩn không thể nuôi cấy trên môi trường nhân tạo mà đòi hỏi môi trường mô sống, ví dụ như Rickettsia và Chlamydia. Chúng phải tăng trưởng trong trứng đã thụ tinh (có phôi), mô nuôi cấy, động vật và các môi trường khác có tế bào sống. Phát hiện và nuôi cấy các vi sinh vật này khá khó khăn.

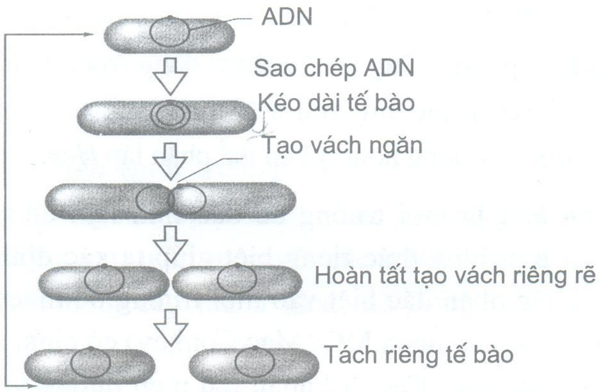
2. SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN

2.1. Khái niệm

Sự tăng trưởng tế bào. Trong vi sinh học, tăng trưởng được định nghĩa là sự gia tăng số tế bào. Tăng trưởng là hoạt động cần thiết của vi sinh vật để duy trì loài. Hiểu biết sự tăng trưởng của vi sinh vật không chỉ là kiến thức khoa học cơ bản mà còn để kiểm soát tăng trưởng chúng.

Tế bào vi khuẩn là bộ máy tổng hợp có thể tự nhân đôi với sự tham gia của khoảng 2.000 phản ứng hóa học.

Sinh sản phân đôi. Ở hầu hết tế bào nhân nguyên thủy, sự tăng trưởng của một tế bào riêng rẽ kéo dài đến khi tế bào chia thành hai tế bào mới gọi là sinh sản phân đôi (hai tế bào có từ một tế bào). Khi nuôi một tế bào trực khuẩn, ví dụ *Escherichia coli*, tế bào kéo dài đến khoảng chiều dài của hai tế bào nhỏ nhất và tạo vách ngăn để tách thành hai tế bào con (hình 3.1).



Hình 3.1. Quá trình sinh sản phân đôi ở vi sinh vật nhân nguyên thủy hình que

Thời gian cần để hoàn tất chu kỳ tăng trưởng của vi khuẩn rất khác nhau tùy thuộc nhiều yếu tố về dinh dưỡng và di truyền. Ở điều kiện tốt nhất, vi khuẩn *E. coli* có thể hoàn tất chu kỳ này trong khoảng 20 phút; một số vi khuẩn có thể tăng trưởng nhanh hơn *E. coli*, nhưng nhiều vi khuẩn tăng trưởng chậm hơn nhiều. Kiểm soát sự phân chia tế bào là một quá trình phức tạp gắn liền với việc sao chép nhiễm sắc thể.

Một số định nghĩa

Sự tăng trưởng là sự gia tăng về số lượng tế bào vi sinh vật và cũng có thể đo bằng sự gia tăng *sinh khối* vi sinh vật.

Tốc độ tăng trưởng là sự thay đổi về số tế bào hoặc sinh khối tế bào trong một đơn vị thời gian.

Thời gian thế hệ là thời gian cần để số tế bào nhân đôi và đôi khi cũng được gọi là thời gian nhân đôi.

Tăng trưởng lũy thừa là sự tăng trưởng có số tế bào tăng gấp đôi ở mỗi giai đoạn (hình 3.2.a). Nếu vẽ đồ thị biểu diễn số tế bào theo logarit và thời gian theo số học (đồ thị *bán logarit*), ta có đường biểu diễn logarit 10 ($\log_{10}$) số tế bào là một đường thẳng (hình 3.2b). Từ đường thẳng này có thể đọc ngay số tế bào đang tăng trưởng lũy thừa hoặc ước lượng thời gian thế hệ .

Một trong những đặc trưng của tăng trưởng lũy thừa là ban đầu *tốc độ* gia tăng số tế bào chậm nhưng sau đó tăng lên nhanh do số tế bào tăng theo lũy thừa. Ví dụ trong thí nghiệm ở hình 3.2, *tốc độ* sản xuất tế bào trong 30 phút tăng trưởng khi bắt đầu là 1 tế bào trong 30 phút. Tuy nhiên ở giữa 4 và 4,5 giờ, tốc độ sản xuất tế bào là 256 tế bào trong 30 phút.

Tính thời gian thế hệ. Trong tăng trưởng lũy thừa, số tế bào vi khuẩn nuôi cấy gia tăng theo cấp số nhân của 2. Khi 2 tế bào nhân đôi (để trở thành 4 tế bào), ta có thể biểu diễn là $2^1 \rightarrow 2^2$. Khi 4 tế bào trở thành 8, ta có thể biểu diễn là $2^2 \rightarrow 2^3$, và v.v.... Sau n lần nhân đôi trong giai đoạn tăng trưởng lũy thừa, ta có:

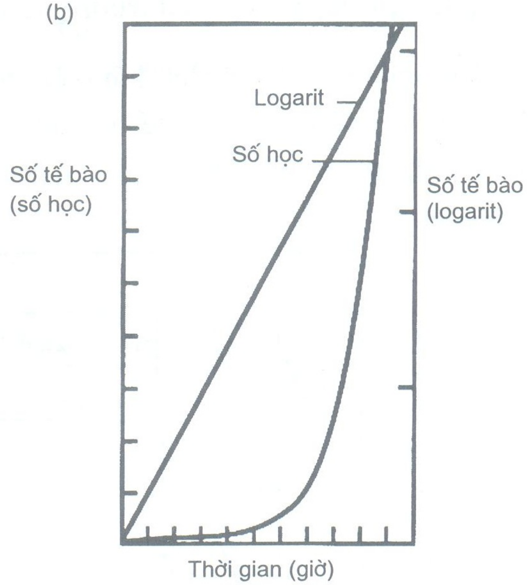
$$N = N_0 2^n$$

trong đó N = số tế bào cuối cùng, N_0 = số tế bào ban đầu và n = *số thế hệ* trong giai đoạn lũy thừa. Thời gian thế hệ g của dân số tế bào được tính là t/n, trong đó t là giờ hoặc phút tăng trưởng lũy thừa. Như vậy khi biết số tế bào ban đầu và kết thúc trong dân số tế bào tăng trưởng lũy thừa thì có thể tính n và từ đó tính thời gian thế hệ g.

(a)

Thời gian (giờ)	Tổng số tế bào
0	1
0.5	2
1	4
1.5	8
2	16
2.5	32
3	64
3.5	128
4	256
4.5	512
5	1.024
5.5	2.048
:	:
10	1.048.576

(b)



Hình 3.2. Tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật nuôi cấy

(a) Số liệu dân số nhân đôi mỗi 30 phút.
(b) Đường vẽ số liệu theo số học (trục tung trái) và theo logarit (trục tung phải).

Tính n từ phương trình $N = N_0 2^n$ như sau:

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0{,}301}$$

$$= 3{,}3\ (\log N - \log N_0)$$

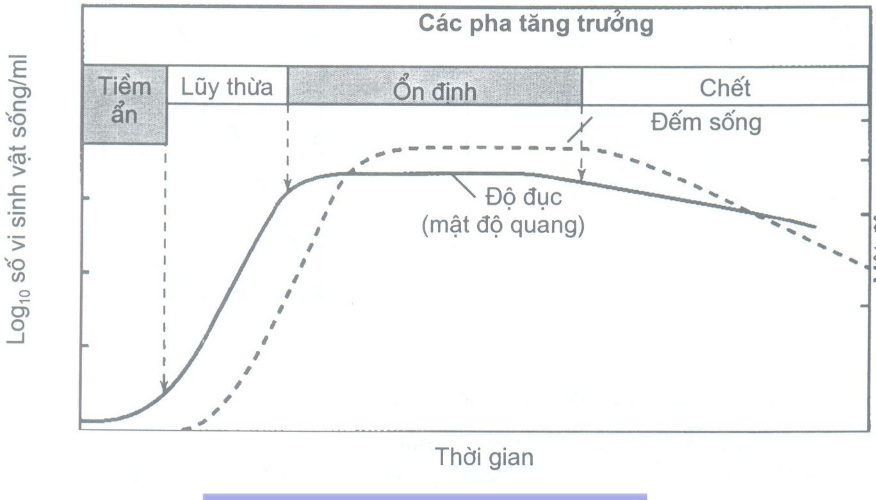
Từ số đo N và N_0 có thể tính được n và thời gian thế hệ.

Một chỉ số khác của tốc độ tăng trưởng là *hệ số tốc độ tăng trưởng*, viết tắt là *k*. Hệ số tốc độ tăng trưởng có thể được tính là $k = \ln 2 \times g^{-1} = 0{,}693 \times g^{-1}$ và có đơn vị là đảo nghịch của giờ (giờ$^{-1}$). Khi g là số đo thời gian để số tế bào trong quần thể gấp đôi lên, k là số đo số thế hệ xảy ra trên một đơn vị thời gian trong tăng trưởng lũy thừa.

Khi biết n và t, người ta có thể tính g và k cho các vi sinh vật khác nhau nuôi ở các điều kiện khác nhau. Điều này có ích để tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật và cũng để kiểm tra ảnh hưởng dương hoặc âm của một số biện pháp xử lý vi sinh vật.

2.2. Sự tăng trưởng trên môi trường lỏng và chu kỳ tăng trưởng của quần thể

Khi nuôi cấy trong bình kín (còn gọi là nuôi cấy mẻ), *đường cong tăng trưởng* điển hình cho một quần thể tế bào được minh họa như trong hình 3.3. Có thể chia đường cong tăng trưởng này thành các pha khác nhau là *pha tiềm ẩn*, *pha lũy thừa*, *pha ổn định* và *pha chết*.



Hình 3.3. Đường cong tăng trưởng điển hình của quần thể vi khuẩn

Pha tiềm ẩn

Trong môi trường mới, vi khuẩn không bắt đầu tăng trưởng ngay, mà chỉ sau một giai đoạn thời gian gọi là pha tiềm ẩn. Pha này có thể ngắn hoặc kéo dài tùy trạng thái nuôi cấy và các điều kiện tăng trưởng. Nếu cấy vi sinh vật đang tăng trưởng lũy thừa vào cùng một loại môi trường và ở cùng các điều kiện nuôi cấy thì sẽ không có giai đoạn tiềm ẩn và tăng trưởng lũy thừa sẽ bắt đầu ngay lập tức. Tuy nhiên nếu cấy vi sinh vật già (pha ổn định) và không cấy vào cùng loại môi trường thì thường sẽ có giai đoạn tiềm ẩn do các tế bào này bị cạn kiệt các thành phần thiết yếu và cần có thời gian để tổng hợp lại các thành phần đó. Khi chuyển từ môi trường giàu qua môi trường nghèo hơn, vi khuẩn cũng trải qua giai đoạn tiềm ẩn. Đây là vì khi tăng trưởng trong môi trường nuôi cấy đặc biệt, tế bào phải có đồng bộ đầy đủ các enzym để tổng hợp các chất chuyển hóa thiết yếu không có trong môi trường đó. Khi chuyển vào môi trường mới, cần có thời gian để tổng hợp các enzym mới.

Pha lũy thừa

Như đã được trình bày ở phần trên, trong pha này số tế bào tăng theo cấp số nhân. Các tế bào trong pha này thường có trạng thái mạnh khỏe nhất và là trạng thái lý tưởng để nghiên cứu về enzym hoặc các thành phần khác của tế bào. Tất cả các thành phần đo được của tế bào như protein, ARN, ADN hoặc sinh khối đều gia tăng cùng tốc độ. Vì tỉ lệ các thành phần tế bào duy trì không đổi suốt giai đoạn này, nên có thể xác định thay đổi số lượng của bất cứ phần đặc biệt nào đó của tế bào bằng cách đo sự thay đổi của một thành phần.

Trong thời kỳ này, dân số vi khuẩn gia tăng, cho tới khi môi trường bị cạn dần chất dinh dưỡng hoặc độc tố tích trữ trong môi trường do hiện tượng biến dưỡng thải ra. Khi nồng độ tế bào vi khuẩn khoảng 10^9/ml thì sự khuếch tán oxy trong môi trường không thực hiện được, do đó sự tăng trưởng sẽ giảm.

Hầu hết các vi sinh vật đơn bào đều có tăng trưởng lũy thừa nhưng tốc độ tăng trưởng lũy thừa khác nhau rất nhiều. Tốc độ tăng trưởng lũy thừa chịu ảnh hưởng bởi các điều kiện môi trường (nhiệt độ, thành phần môi trường nuôi cấy) cũng như các đặc tính di truyền của chính vi sinh vật. Nói chung các vi sinh vật nhân nguyên thủy tăng trưởng nhanh hơn nhân thật, và các sinh vật nhân thật nhỏ tăng trưởng nhanh hơn các sinh vật nhân thật lớn.

Pha lũy thừa kéo dài chỉ 4 - 10 giờ cho đa số vi khuẩn tăng trưởng nhanh.

Ý nghĩa thực tế:

– Nếu ta cấy vi khuẩn ở giai đoạn logarit vào môi trường mới cùng thành phần thì vi khuẩn sẽ tăng trưởng logarit ngay, tránh được giai đoạn tiềm ẩn.

– Để giữ vi khuẩn ở giai đoạn logarit một cách liên tục, phải dùng phương pháp thay thế môi trường mới liên tục với những thiết bị như Chemostat, Bretogen ...

Pha ổn định

Khi nuôi cấy trong môi trường lỏng, tăng trưởng lũy thừa không diễn ra vô hạn định. Đến một thời điểm hoặc là (1) dinh dưỡng thiết yếu của môi trường nuôi bị dùng hết hoặc (2) một vài sản phẩm thải của vi sinh vật đạt đến mức kiềm chế và làm ngưng tăng trưởng lũy thừa hoặc cả hai cùng xảy ra. Tại thời điểm đó quần thể tế bào đi vào pha ổn định.

Trong pha ổn định, số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Tuy không có sự tăng trưởng nữa nhưng nhiều hoạt động của tế bào có thể vẫn tiếp tục, kể cả chuyển hóa năng lượng và quá trình sinh tổng hợp.

Pha suy thoái (pha chết)

Sau pha ổn định, tỷ suất chết tăng dần đến một mức độ cố định với thời gian, và thay đổi tùy thuộc vào loại vi khuẩn và điều kiện môi trường. Trong vài trường hợp, chết đồng nghĩa với sự ly giải tế bào. Thông thường sau khi đa số tế bào đã chết, tỷ suất chết giảm rõ rệt vì số ít tế bào sống sót sẽ tồn tại trong vài tháng hoặc vài năm với chất dinh dưỡng do tế bào chết thoái hóa thải ra.

Cần lưu ý là các pha của đường cong tăng trưởng vi khuẩn trình bày trong Hình 3.1 phản ánh các biến cố trong quần thể tế bào, không phải trong các tế bào riêng biệt. Các khái niệm pha tiềm ẩn, pha lũy thừa, pha ổn định và pha chết không áp dụng cho các tế bào riêng lẻ mà chỉ dùng cho quần thể tế bào vi sinh vật.

2.3. Đo sự tăng trưởng

Đo sự tăng trưởng dân số bằng cách theo dõi sự thay đổi số lượng tế bào hoặc trọng lượng khối tế bào. Có một số phương pháp đếm số tế bào hoặc ước lượng khối tế bào, tùy vi sinh vật hoặc mục đích mà chọn phương pháp thích hợp.

Xác định toàn phần vi khuẩn

Đếm tổng số tế bào

Phương pháp dùng kính hiển vi để đếm số tế bào trong dân số gọi là phương pháp *đếm trực tiếp bằng kính hiển vi*. Tiêu bản đếm có thể là mẫu khô hoặc mẫu lỏng. Với các mẫu lỏng, phải dùng các *buồng đếm* đặc biệt. Các buồng đếm này có đường kẻ ô chia bề mặt bản kính thành những ô vuông nhỏ. Phủ một thể tích rất nhỏ và chính xác lên mỗi ô vuông trên vùng kẻ vạch. Đếm dưới kính hiển vi số tế bào trên một đơn vị diện tích, suy ra số tế bào trong thể tích.

Đây là cách ước lượng số tế bào vi sinh vật nhanh, tuy nhiên nó có một số giới hạn: (1) Không phân biệt các tế bào chết với sống. (2) Có thể đếm sót một số tế bào nhỏ. (3) Khó đạt được chính xác. (4) Cần có kính hiển vi phản pha trong trường hợp mẫu không nhuộm được. (5) Phương pháp này không thích hợp đối với huyền phù có mật độ tế bào thấp.

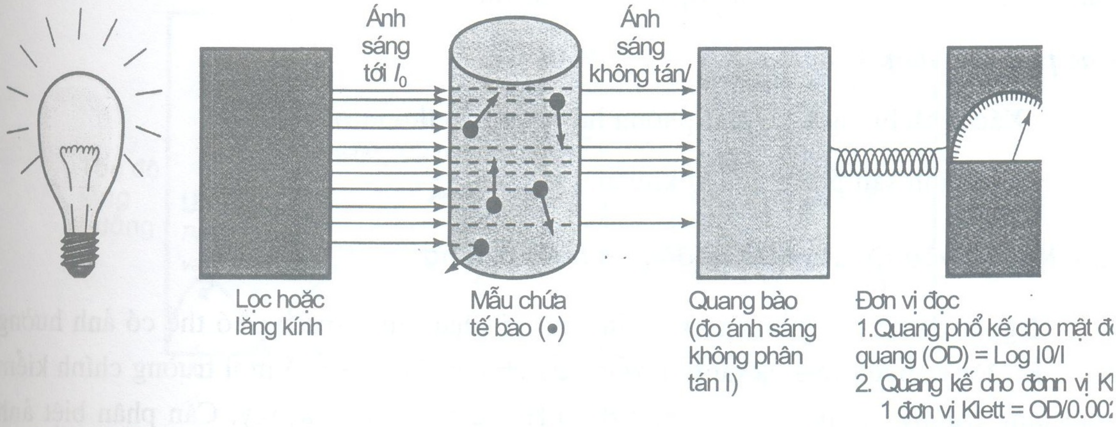
Đo tỉ trọng của tế bào

Phương pháp này đo trọng lượng khô của tế bào trong một đơn vị thể tích môi trường lỏng bằng cách rửa sạch khối vi khuẩn, làm khô rồi cân. Kỹ thuật này khó chính xác.

Đo độ đục số tế bào

Đo độ đục là phương pháp nhanh và khá hữu dụng để ước lượng số tế bào. Phương pháp dựa vào sự phân tán ánh sáng khi đi qua huyền phù tế bào. Càng có nhiều tế bào, ánh sáng càng bị phân tán và do đó huyền phù càng đục hơn. Đo độ đục có thể sử dụng *quang kế* hoặc *quang phổ kế*, các thiết bị này cho ánh sáng đi qua huyền phù tế bào và phát hiện lượng ánh sáng không phân tán (hình 3.4).

Ở nồng độ cao, ánh sáng phân tán bởi tế bào này có thể phân tán trở lại bởi tế bào khác và hiện vào quang kế như là nó chưa hề bị phân tán, lúc đó sẽ mất tuyến tính giữa số tế bào và độ đục. Tuy nhiên trong giới hạn cho phép, đo độ đục rất chính xác, có ưu điểm là nhanh và dễ thực hiện. Ngoài ra tiến hành đo độ đục thường không hoặc ít làm tiêu hủy tế bào. Vì vậy đo độ đục được áp dụng rộng rãi để theo dõi tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật nuôi, cùng mẫu đó có thể kiểm tra lặp lại và vẽ số đo theo thời gian trên giấy bán logarit, và được dùng để tính thời gian thế hệ của vi sinh vật nuôi.



Hình 3.4. Đo độ đục của tăng trưởng vi sinh vật

Các phương pháp khác

Có thể đo nồng độ tế bào bằng cách đo nồng độ của một chất cần thiết trong thành phần cấu tạo tế bào như định lượng nitơ toàn phần bằng phương pháp Kjehldal.

Xác định vi khuẩn sống

Đếm sống (đếm đĩa hoặc đếm khuẩn lạc)

Tế bào sống được định nghĩa là tế bào có khả năng phân chia và tạo tế bào con. Cách thông thường để tiến hành đếm sống là xác định số tế bào trong mẫu có khả năng tạo khuẩn lạc trên môi trường thạch thích hợp, mỗi tế bào sống có thể tạo một khuẩn lạc. Có hai cách tiến hành đếm đĩa: phương pháp trải đĩa và phương pháp đổ đĩa.

Đếm sống có thể có sai số lớn, để đảm bảo chính xác phải tiến hành rất cẩn thận và lặp lại vài đĩa ở các độ pha loãng chính. Thường phải xác định các điều kiện nuôi (môi trường, nhiệt độ, thời gian) để có số khuẩn lạc tối đa đối với vi sinh vật nghiên cứu và sau đó luôn áp dụng các điều kiện này.

Kết quả đếm sống thường được biểu thị bằng *đơn vị tạo khuẩn lạc* (CFU) thay cho *số tế bào sống*.

Đếm sống tuy khó thực hiện nhưng cho thông tin tốt nhất về số tế bào sống nên được áp dụng rộng rãi. Đây là quy trình thường qui trong kiểm tra thực phẩm, sản phẩm từ sữa, y tế và vi sinh vật nước. Ưu điểm của phương pháp là có độ nhạy cao: có thể đếm được mẫu chứa vài tế bào nên cho phép phát hiện nhạy các sản phẩm hoặc nguyên liệu nhiễm vi sinh vật. Ngoài ra nếu trong quy trình đếm sống dùng môi trường nuôi cấy chọn lọc cao và điều kiện tăng trưởng đặc biệt sẽ cho phép chỉ đếm các loại tế bào đặc biệt trong dân số hỗn hợp các vi sinh vật.

Các phương pháp khác

– Xác định lượng CO_2 giải phóng hay oxy hấp thu.

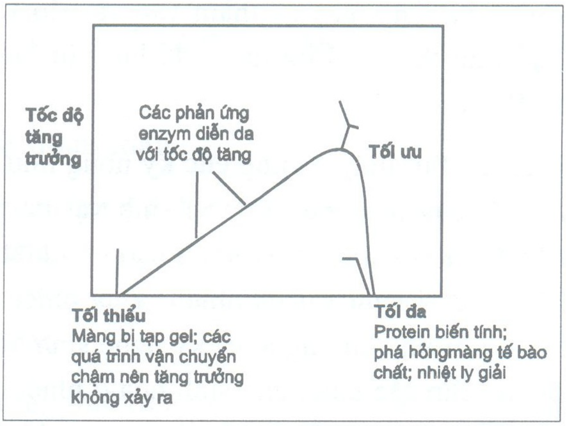
– Xác định sản phẩm của vi khuẩn.

2.4. Những yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng

Ngoài tương tác giữa các vi sinh vật với nhau, môi trường có thể có ảnh hưởng đáng kể đến chuyển hóa và tăng trưởng của chúng. Bốn yếu tố môi trường chính kiểm soát tăng trưởng vi sinh vật là nhiệt độ, pH, nước có sẵn và oxy. Cần phân biệt ảnh hưởng của môi trường lên khả năng sống của vi sinh vật với ảnh hưởng lên sự tăng trưởng (sinh sản).

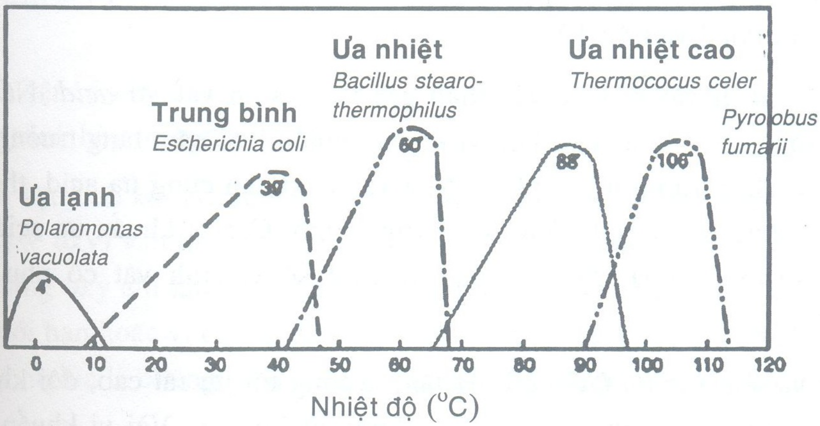
Nhiệt độ

Nhiệt độ có thể ảnh hưởng lên vi sinh vật sống theo hai cách ngược nhau. Khi nhiệt độ tăng, các phản ứng hóa học và phản ứng enzym trong tế bào diễn ra ở tốc độ nhanh hơn và sự tăng trưởng trở nên nhanh hơn. Tuy nhiên khi *vượt* qua một nhiệt độ nhất định, một số protein có thể bị phân hủy không thể phục hồi. Mỗi vi sinh vật có *nhiệt độ tối thiểu* mà dưới nhiệt độ đó sự tăng trưởng không diễn ra nữa, *nhiệt độ tối đa* mà nếu cao hơn đó không thể có tăng trưởng (hình 3.5).



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên tốc độ tăng trưởng và hiệu ứng phân tử của tế bào

Có thể phân loại vi sinh vật theo nhiệt độ tối ưu của chúng thành bốn nhóm: *nhóm ưa lạnh* (*Psychrophile)* - có nhiệt độ tối ưu thấp, *nhóm trung bình* (*Mesophile*) - có nhiệt độ tối ưu ở khoảng giữa, *nhóm ưa nhiệt* (*Thermophile*) - có nhiệt độ tối ưu cao và *nhóm ưa nhiệt cao* - có nhiệt độ tối ưu rất cao (hình 3.6).



Hình 3.6. Mối liên hệ giữa nhiệt độ với tốc độ tăng trưởng của các nhóm vi sinh vật

Vi sinh vật ưa nhiệt trung bình có ở động vật máu nóng và trong môi trường cạn và dưới nước ở vùng khí hậu nhiệt đới.

Vi sinh vật ưa lạnh và ưa nhiệt được tìm thấy ở vùng môi trường không thường lạnh cũng không thường nóng. Các vi sinh vật ưa lạnh và chịu được lạnh có nhiệt độ tối ưu là 15°C hoặc thấp hơn, nhiệt độ tăng trưởng tối đa dưới 20°C và nhiệt độ tăng trưởng tối thiểu là 0°C hoặc thấp hơn.

Lưu ý: Khi thêm vào huyền phù vi khuẩn khoảng 10% glycerol và dimethylsulfoxid (DMSO), các chất này sẽ thấm vào và bảo vệ tế bào, làm giảm sự mất nước và ngăn sự tạo tinh thể đá. Ứng dụng để lưu giữ huyền dịch vi sinh vật ở nhiệt độ thấp (–70 đến –196°C).

Vi sinh vật ưa nhiệt cao tìm thấy ở vùng cực kỳ nóng như suối nước nóng, mạch nước phun và lỗ thủy nhiệt của biển sâu. Các vi sinh vật ưa nhiệt có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu cao hơn 45°C và vi sinh vật ưa nhiệt cao có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu cao hơn 80°C (hình 3.6). Các vi sinh vật ưa nhiệt và ưa nhiệt cao có nhiều ưu điểm được quan tâm trong các qui trình công nghệ và kỹ nghệ sinh học. Chúng có khả năng sản xuất các enzym xúc tác cho các phản ứng sinh hóa ở nhiệt độ cao và nói chung là ổn định hơn các enzym của nhóm vi sinh vật ưa nhiệt trung bình, do đó các chế phẩm enzym này có tuổi thọ dài hơn. Một ví dụ về áp dụng thực nghiệm vô cùng quan trọng của enzym ổn định với nhiệt độ là ADN polymerase phân lập từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* gọi là *Taq* polymerase.

Ảnh hưởng của nồng độ hydro (pH)

Các vi sinh vật đều có một khoảng pH tăng trưởng và pH tối ưu. Môi trường tự nhiên thường có pH 5-9 và là pH tối ưu cho đa số các vi sinh vật, rất ít loài có thể tăng trưởng ở pH dưới 2 và trên 10.

Các vi sinh vật sống ở pH thấp gọi là vi sinh vật *ưa acid*. Nấm là nhóm có khuynh hướng chịu đựng acid hơn vi khuẩn, nhiều loại nấm tăng trưởng tối ưu ở pH ≤ 5 và một số tăng trưởng tốt ở pH 2. Một vài vi khuẩn cũng ưa acid, thậm chí ưa acid bắt buộc, không thể tăng trưởng ở pH trung tính. Các vi khuẩn ưa acid bắt buộc như *Helicobacterium pylori, Thiobacillus* và một số vi sinh vật cổ như *Sulfolobus* và *Thermoplasma*.

Các vi sinh vật *ưa kiềm* có pH tăng trưởng tối ưu rất cao, đôi khi là pH 10-11. *Vibrio cholerae* và nhiều loài Bacillus thuộc nhóm này. Vài vi khuẩn ưa kiềm được dùng trong công nghệ sản xuất enzym protease và lipase hoạt động tốt ở pH kiềm, làm chất tẩy giặt.

Lưu ý, pH tối ưu cho tăng trưởng chỉ là pH môi trường ngoại bào, pH nội bào phải được duy trì gần pH trung tính nhằm ngăn chặn sự phân hủy các đại phân tử không bền với acid hoặc base trong tế bào.

Vi sinh vật có pH tăng trưởng tối ưu ở khoảng 6-8, gọi là nhóm *ưa trung tính*. Vì các phản ứng chuyển hóa tiêu thụ hoặc sản xuất các chất acid hoặc base, nên thường phải thêm các chất đệm vào để giữ cho pH ổn định tương đối trong quá trình nuôi vi sinh vật. Nói chung các đệm pH này chỉ hoạt động ở khoảng pH hẹp nên tùy pH mà chọn loại đệm thích hợp. Đệm phosphat hay được dùng dạng KH_2PO_4 để có dải pH gần trung tính (pH 6-7,5), phải dùng thực nghiệm để xác định đệm tối ưu trong từng trường hợp.

Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu

Nước là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng vi sinh vật trong tự nhiên. Nước có sẵn không chỉ phụ thuộc hàm lượng nước trong môi trường (độ ẩm hoặc khô của nơi vi sinh vật sống) mà còn cả vào các chất tan trong nước như muối, đường và các hợp chất khác.

Khi tăng trưởng trong môi trường có hoạt tính nước thấp, vi sinh vật lấy nước từ môi trường bằng cách tăng nồng độ chất tan nội bào. Để làm điều này, vi sinh vật bơm các ion vô cơ từ môi trường vào tế bào hoặc tổng hợp hoặc cô đặc chất hữu cơ hòa tan. Cầu khuẩn Gram dương có khả năng chịu đựng halogen (người ta dùng môi trường chứa 7,5% NaCl để phân lập chúng) do dùng acid amin prolin làm chất tan cạnh tranh. Một số vi khuẩn cực ái halogen sản xuất chất tan cạnh tranh ectoin, là dẫn xuất của acid amin vòng prolin. Các nấm men ưa khô và tảo xanh ái halogen sản xuất chất tan cạnh tranh chủ yếu là glycerol.

Oxy

Các vi sinh vật có nhu cầu hoặc khả năng chịu đựng oxy khác nhau, có thể chia thành nhóm như trình bày trong bảng 3.2

Các vi sinh vật *hiếu khí* là các loài có khả năng tăng trưởng ở không khí đầy oxy (không khí có 21% oxy) và chịu được nồng độ oxy cao. Các vi sinh vật *vi hiếu khí* là các vi sinh vật dùng oxy chỉ khi oxy ở mức thấp hơn trong không khí do khả năng hô hấp của chúng giới hạn hoặc vì chúng chứa một số phân tử nhạy với oxy. Nhiều vi sinh vật *hiếu khí tùy ý*, nghĩa là chúng có thể tăng trưởng ở điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí.

Các vi sinh vật *kỵ khí* là các vi sinh vật thiếu hệ thống hô hấp dùng oxy làm chất nhận điện tử cuối cùng. Có hai loại vi sinh vật kỵ khí: *vi sinh vật kỵ khí chịu được* *không khí* – có thể chịu được oxy và tăng trưởng được khi có oxy dù không dùng, và vi sinh vật kỵ khí bắt buộc (hoặc tuyệt đối) – bị giết bởi oxy. Các vi sinh vật này bị giết bởi oxy vì chúng không thể khử độc một số sản phẩm chuyển hóa của oxy. Oxy bị khử sẽ sinh ra một số sản phẩm độc như hydroperoxid (H_2O_2), superoxid (O^{2-}) và gốc hydroxyl ($OH^{\bullet}$). Nhiều vi sinh vật kỵ khí bắt buộc có nhiều enzym flavin, phản ứng tự phát với oxy tạo các sản phẩm độc.

***Bảng 3.2.** Mối liên hệ của oxy với vi sinh vật*

Nhóm	Mối liên hệ với oxy	Loại chuyển hóa	Vi khuẩn
Hiếu khí			
Bắt buộc	Cần	Hô hấp hiếu khí	*M. luteus, M. tuberculosis, Acetobacter, C. diphtheriae, P. aeruginosa, B. pertussis*
Tùy ý	Không cần nhưng tăng trưởng tốt hơn nếu có oxy	Hô hấp hiếu khí, kỵ khí, lên men	*E. coli*
Vi hiếu khí	Cần nhưng với mức thấp hơn trong không khí	Hô hấp hiếu khí	*Staphylococcus, Campylobacter, Actynomyces*
Kỵ khí			
Chịu được không khí	Không cần và tăng trưởng tốt hơn nếu không có oxy	Lên men	*Streptococcus pyogenes*
Bắt buộc	Có hại hoặc chết	Lên men hoặc hô hấp kỵ khí	*C. tetani, C. botulinum, C. perfringens*

Các dạng độc của oxy

Các dạng có độc tính cao của oxy là anion superoxid (O^{2-}), hydro peroxid (H_2O_2) và gốc hydroxyl ($OH^{\bullet}$). Tất cả các dạng này là sản phẩm không chủ ý khi hô hấp khử oxy thành nước (hình 3.7). Các flavoprotein, quinone, thiol và các protein sắt - sulfur cũng có thể khử oxy thành O^{2-}. Superoxid hoạt hóa cao và có thể oxy hóa bất cứ hợp chất hữu cơ nào trong tế bào, kể cả các đại phân tử. Các peroxid như H_2O_2 có thể phân hủy các thành phần của tế bào nhưng nói chung không độc với tế bào như superoxid hoặc gốc hydroxyl. Gốc $OH^{\bullet}$ là hoạt hóa nhất trong các loại oxy độc, nó có thể oxy hóa ngay lập tức bất cứ hợp chất hữu cơ nào trong tế bào. Tuy nhiên nguồn $OH^{\bullet}$ chủ yếu là ion phóng xạ mà hầu như các tế bào ít gặp phải. Lượng nhỏ $OH^{\bullet}$ có thể sản xuất từ H_2O_2 (hình 3.7) nhưng nguồn $OH^{\bullet}$ này bị hạn chế khi peroxid không tích lũy trong tế bào (do hoạt động của catalase).

Các enzym phân hủy oxy độc

Để phân hủy oxy độc, vi sinh vật có các enzym catalase, peroxidase, superoxid dismutase (hình 3.8), trong đó enzym catalase phổ biến nhất. Nói chung vi sinh vật hiếu khí và hiếu khí tùy ý có cả superoxid dismutase và catalase, mặc dù một số hiếu khí bắt buộc không có catalase.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \quad \textbf{Superoxid}$$
$$O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \quad \textbf{Hydro peroxid}$$
$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^\bullet \quad \textbf{Gốc hydroxyl}$$
$$OH^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \quad \textbf{Nước}$$

Tổng cộng: $O_2 + 4\,e^- + 4H^+ \rightarrow 2\,H_2O$

Hình 3.7. Khử O_2 thành nước bằng cách thêm điện tử từng bước

Tất cả các dạng trung gian đều hoạt động và độc với tế bào.

***(a)* Catalase:**

$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$

***(b)* Peroxidase:**

$H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2\,H_2O + NAD^+$

***(c)* Superoxid dismutase:**

$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

***(d)* Phối hợp superoxid dismutase/catalase:**

$4\,O_2^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O_2 + 3\,O_2$

Hình 3.8. Các enzym phân hủy các loại oxy độc

Superoxid dismutase rất cần cho các tế bào hiếu khí, các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc có ít (hoặc hoàn toàn không có) enzym này nên oxy độc với chúng.

Ý nghĩa trong nuôi cấy vi sinh vật

Nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí phải lắc hoặc khuấy hoặc sục khí tiệt trùng vào môi trường. Vì oxy chỉ hòa tan kém trong nước, tốc độ khuếch tán oxy từ không khí không đủ nhanh cho vi sinh vật dùng. Cung cấp không khí trong nuôi cấy vi khuẩn hiếu khí là vấn đề kỹ thuật lớn vì phải cung cấp lượng khí lớn và kéo dài mà oxy chỉ tan ít trong nước và lượng oxy thay thế từ không khí khuếch tán chậm hơn lượng sử dụng bởi vi sinh vật. Khi nồng độ tế bào 4-5 x 10^9 trong 1 ml thì tốc độ phân tán oxy vào tế bào bị giới hạn hoàn toàn, không có sự tăng trưởng thêm.

Để *nuôi cấy kỵ khí* cần phải lấy oxy ra khỏi môi trường bằng các phương pháp đặc biệt. Các vi sinh vật kỵ khí có độ nhạy với oxy khác nhau, tùy loại mà chọn qui trình thích hợp để khử oxy trong môi trường nuôi. Đối với vi sinh vật không quá nhạy với lượng nhỏ oxy, dụng cụ nuôi (bình hoặc ống) được đổ môi trường đầy ắp và vặn chặn nút. Có thể thêm chất khử oxy thành nước như thêm thioglycolat hoặc loại hoàn toàn oxy bằng cách cho khí tiêu oxy vào trong bình đựng. Không khí trong bình được thay thế bằng hỗn hợp hydro và carbonic, các chất xúc tác hóa học sẽ tiêu thụ hết oxy sót lại trong bình hoặc môi trường nuôi.

Môi trường lỏng thioglycolat thường hay được dùng để kiểm tra nhu cầu oxy của vi sinh vật.

Sau khi thioglycolat phản ứng với oxy trong khắp ống, oxy chỉ có thể truyền ở gần phía trên ống nơi môi trường tiếp xúc với không khí. Các vi sinh vật hiếu khí chỉ mọc ở phía trên ống. Các vi sinh vật hiếu khí tùy ý tăng trưởng khắp ống nhưng tốt nhất là ở gần phía trên. Các vi sinh vật vi hiếu khí mọc ở gần nhưng không ngay tại mặt trên. Các vi sinh vật kỵ khí chỉ tăng trưởng gần đáy ống nơi oxy không thể truyền đến. Chỉ thị khử nhuộm màu như resazurin được thêm vào môi trường sẽ đổi màu khi có oxy và do đó cho phép quan sát độ truyền oxy vào môi trường (hình 3.9).

a b c d e

Hình 3.9. Tăng trưởng hiếu khí (a), kỵ khí (b), tùy ý (c), vi hiếu khí (d) và kỵ khí chịu được không khí (e)

3. ỨNG DỤNG

3.1. Kiểm soát vi sinh vật

Tiệt trùng và tẩy trùng để kiểm soát vi sinh vật trên bề mặt cơ thể và đồ vật. Hóa trị liệu để kiểm soát vi sinh vật nhiễm trong mô sống. Các phương pháp vật lý và hóa học thường được dùng để tiêu diệt vi sinh vật trên bề mặt gồm tất cả các tế bào sống nói chung. Ngược lại, các tác nhân hóa trị liệu phải tiêu diệt chọn lọc vi sinh vật và không ảnh hưởng tới các tế bào chủ.

Một số định nghĩa

Sự tiệt trùng (sterilisation) là quá trình tiêu hủy tất cả vi sinh vật sống, có thể thực hiện nhờ tác nhân vật lý hoặc hóa học. *Sự vô trùng (sterility)* là hình thái không có sự sống kể cả mầm sống. *Trạng thái vô trùng (aseptic)* là không có sự hiện diện của vi sinh vật gây bệnh.

Sự tẩy trùng (disinfection) là quá trình tiêu hủy các vi sinh vật có hại nhưng không bao gồm các bào tử vi khuẩn đề kháng. *Chất tẩy trùng (disinfectant)* là tác nhân diệt trùng bề mặt đồ vật.

Chất sát trùng (antiseptic) là chất chống lại hoặc làm giảm sự nhiễm trùng. Các chất này có thể kìm hãm hay giết vi sinh vật, nói chung được áp dụng cho mô sống.

Chất kìm khuẩn (bacteriostatic agent) là những chất ngăn chặn sự sinh sản của vi khuẩn. Vi khuẩn sẽ sinh sản trở lại nếu loại bỏ các tác nhân này.

Chất diệt khuẩn (bacteriocidal agent) có tính chất giết vi khuẩn và không có sự thuận nghịch - vi khuẩn bị giết không còn khả năng sinh sản mặc dù không còn chất diệt khuẩn.

Sự nhiễm (contamination) là sự hiện diện của vi sinh vật không mong muốn. Ở môi trường bệnh viện, nhiễm là sự hiện diện vi sinh vật gây bệnh. Trong dung dịch tiêm truyền tĩnh mạch, thuốc uống, dụng cụ giải phẫu ..., nhiễm là sự hiện diện bất cứ vi sinh vật nào.

Vệ sinh (sanitation) là sự kiểm soát sức khỏe cộng đồng và những điều kiện tốt nhất cho sức khỏe.

Các phương pháp vật lý kiểm soát vi sinh vật

Nhiệt ẩm với áp suất

Phương pháp này được sử dụng cho hơn 90% sản phẩm y tế, dụng cụ và môi trường.

Hấp ở 121°C, áp suất 1,1 kg/cm^2 làm cấu trúc tế bào bị phá vỡ hoàn toàn, protein và acid nucleic bị biến tính. Khi sử dụng nồi hấp cần phải có thời gian để nhiệt độ truyền qua tất cả vật liệu.

Xác định mức độ tiệt trùng đạt được bằng (1) Giấy tẩm chất hóa học nhạy với nhiệt, sẽ đổi màu khi tiếp xúc với nhiệt độ tiêu chuẩn, nhưng không hoàn toàn đáng tin cậy về độ tiệt trùng; (2) Giấy thử tẩm bào tử vi khuẩn (có bán sẵn) được đặt vào trung tâm các vật liệu trong nồi hấp. Khi quá trình tiệt trùng hoàn tất, băng giấy bào tử lại được đặt vào canh thang. Nếu không có vi khuẩn trong canh thang sau khi nuôi cấy thì vật liệu được coi là vô trùng.

Nhiệt ẩm không áp suất

Đun sôi tiêu hủy phần lớn vi khuẩn trong vài phút, tuy nhiên bào tử và vài vi khuẩn có thể sống sót ở nhiệt độ sôi trong vài giờ. Phương pháp Pasteur hữu ích trong xử lý một số dung dịch như sữa, nước giải khát. Phương pháp Pasteur xảy ra qua cả hai quá trình: đun nóng đến 62,8°C trong 30 phút hoặc đun nóng đến 71,7°C trong 15 phút. Phương pháp Pasteur không tiệt trùng, nhưng diệt vi khuẩn gây bệnh có thể nhiễm trong dung dịch. Nó cũng làm giảm lượng lớn các vi khuẩn khác trong dung dịch và như vậy làm chậm đáng kể tốc độ thiu của các sản phẩm như sữa.

Nhiệt khô

Sử dụng lò sấy. Nhiệt khô đòi hỏi nhiệt độ cao hơn, thời gian dài hơn nhiệt ẩm thì mới đạt sự tiệt trùng. Sấy khô 180°C trong 2 giờ diệt được bào tử vi khuẩn. Nhiệt khô được dùng để tiệt trùng dụng cụ thủy tinh, bột và dầu. Một dạng khác của nhiệt khô là sự tiếp xúc dụng cụ hoặc vòng cấy với ngọn lửa trong thời gian ngắn, thiêu các chất thải, tiêu hủy bất cứ vi sinh vật nhiễm nào.

Ánh sáng tử ngoại

Tia UV ở bước sóng 2600 Å diệt tốt các mầm vi sinh vật gây bệnh. Phân tử ADN hấp phụ bước sóng này của tia sẽ bị tăng năng lượng và sắp xếp lại các liên kết hóa học. Trong tiểu phân, nối hóa học mới được tạo giữa hai base thymin sát nhau trên cùng một chuỗi ADN, tạo ADN không chức năng của vi sinh vật bị tia UV kích ứng. Sau đó nếu vi sinh vật này được để trong tối hoặc tiếp xúc ánh sáng trắng, liên kết hóa học có thể được hồi phục chức năng ban đầu và vi sinh vật có thể sống lại.

Ánh sáng mặt trời có tia UV nên diệt được mầm vi sinh vật gây bệnh. Tia UV cũng được sinh bởi đèn thủy ngân. Đặt đèn này trong ống dẫn khí hoặc trên bề mặt sẽ làm giảm lượng lớn vi sinh vật trong vùng chiếu. Tia UV không truyền qua những thứ cứng và có khả năng xuyên sâu yếu, đó là yếu tố giới hạn chỉ sử dụng để diệt trùng bề mặt, dung dịch trong và không khí. Tia UV làm phá hủy mô người và gây ung thư da do đó phải tránh tiếp xúc trực tiếp.

Ion phóng xạ

Các dạng ion phóng xạ như tia X, tia gamma có thể truyền năng lượng lớn hơn tia UV và có hiệu suất diệt vi sinh vật lớn hơn. Phóng xạ giàu năng lượng này thường làm gãy một hay hai chuỗi ADN. Ion phóng xạ có thể truyền qua các sản phẩm như vải, nhựa, dung dịch và thức ăn để có sự tiệt trùng. Hiện nay ion phóng xạ được dùng tiệt trùng các sản phẩm như chỉ khâu trong giải phẫu và đồ nhựa dùng một lần. Nó cũng hiệu quả trong tiệt trùng thịt, có hạn dùng tương đương thịt đóng hộp nóng, lại có nhiều dinh dưỡng và ngon hơn. Thịt loại này được các nhà du hành vũ trụ sử dụng trong các chuyến bay vào không gian.

Lọc

Lọc là phương tiện công hiệu để đuổi phần lớn vi sinh vật khỏi dung dịch và không khí. Dung dịch tiêm truyền, dung dịch chứa các nguyên liệu nhạy với nhiệt độ có thể được loại tế bào vi sinh vật bằng cách cho qua lọc có lỗ nhỏ đủ để giữ lại các tế bào vi khuẩn. Lọc làm bằng amiăng, bông thủy tinh hoặc đất tảo cát sử dụng được nhiều năm. Các màng lọc ester cellulose hoàn toàn trơ về sinh học được sử dụng rộng rãi với cỡ lỗ 0,25 µm. Loại có cỡ lỗ 0,22 µm loại được tất cả vi khuẩn khỏi dung dịch, lọc có lỗ nhỏ hơn sẽ loại được một số virus. Lọc loại này cũng dùng để bẫy và cô đặc vi khuẩn đã phân tán trong thể tích lớn dung dịch. Quá trình này có ích trong kiểm tra vi khuẩn nước uống.

Lọc không khí được làm bằng vật liệu khác nhau sử dụng trong ống dẫn khí để đuổi các tiểu phần vi sinh vật và dạng trơ. Thiết kế mật độ khác nhau của lọc có thể đuổi được số lượng và kích thước các tiểu phần theo mong muốn. Các lọc đặc biệt gọi là lọc tuyệt đối hoặc lọc HEPA (High - Efficacy Particulate Air) gồm sợi thủy tinh xen chặt và đuổi hiệu quả 99,9% tất cả tiểu phần trên không đến kích thước 0,3 µm. Các lọc HEPA loại được tất cả các loại vi sinh vật trong không khí. Ngay cả virus nhỏ 0,02 µm, khi trong không khí chúng thường dính với các tiểu phần lớn hơn của bụi hay nhầy khô nên bị bẫy bởi các lọc HEPA. Các lọc không khí được sử dụng trong hệ thống cung cấp khí cho môi trường bệnh viện như phòng giải phẫu, dưỡng nhi, săn sóc đặc biệt.

Kiểm soát vi sinh vật bằng phương pháp hóa học

Các yếu tố ảnh hưởng tác động tẩy trùng

Thời gian: Không phải tất cả vi sinh vật bị giết cùng một lúc sau khi tiếp xúc với chất tẩy trùng. Do đó chất tẩy trùng phải được giữ tiếp xúc với nguyên liệu đủ lâu để diệt tất cả vi sinh vật. Tác nhân hóa học không tiệt trùng trong đa số trường hợp tiếp xúc ngắn, tuy nhiên nếu kéo dài từ 12 - 14 giờ thì có thể có sự vô trùng.

Nhiệt độ: Hiệu quả sát khuẩn của tác nhân tẩy trùng tăng ở nhiệt độ cao. Phần lớn các chế phẩm tẩy trùng được chuẩn hóa và thực hiện ở nhiệt độ phòng. Thời gian tiếp xúc phải kéo dài khi nguyên liệu được tẩy trùng ở nhiệt độ thấp.

pH: Acid và base trong môi trường cũng ảnh hưởng đến tương tác của chất tẩy trùng với vi sinh vật và có thể làm tăng hay giảm tác dụng (tùy tác nhân).

Loại vi sinh vật: Có sự khác nhau về độ nhạy giữa các loài vi sinh vật. Theo độ nhạy với chất tẩy trùng, vi sinh vật được chia thành ba nhóm:

+ Nhóm A: đa số vi khuẩn và virus có màng bao, ở dạng dinh dưỡng dễ bị giết.
+ Nhóm B: khó giết hơn, gồm vi khuẩn lao và virus không có màng bao.
+ Nhóm C: virus và bào tử vi khuẩn đề kháng cao, như virus gây viêm gan.

Môi trường xung quanh: Sự hiện diện các vật liệu như đất, máu và mủ có thể phản ứng với chất tẩy trùng và làm giảm khả năng của chúng đối với vi sinh vật. Vì vậy, bề mặt và nguyên liệu tẩy trùng phải thật sạch trước khi xử lý với chất tẩy trùng.

Nồng độ chất tẩy trùng: Nói chung nồng độ chất tẩy trùng càng cao thì thời gian giết vi sinh vật càng ngắn. Ở nồng độ thấp, hóa chất có thể kìm khuẩn trong khi ở nồng độ cao chúng có thể diệt khuẩn. Nồng độ cần diệt các vi sinh vật thay đổi tùy vi sinh vật, tùy chất tẩy trùng.

Các nhóm hóa học kháng khuẩn

Dung môi hữu cơ: Cloroform, toluen, cồn.

Kim loại nặng: Hợp chất của thủy ngân, bạc, đồng.

Phenol và dẫn xuất: Phenol, cresol, hexachlorophen, chlorhexidin.

Các halogen: Iod, clo, cồn iod.

Chất tẩy: Hợp chất giống xà phòng nhưng không làm từ chất béo. Dùng như tác nhân làm sạch vì có khả năng nhũ hóa bụi. Không sát khuẩn.

Các tác nhân tác động bề mặt: Hợp chất amoni bậc bốn, chất tẩy anion. Ví dụ dung dịch 5 - 10% formalin làm cố định mô (mùi khó chịu và kích ứng mô nên ít sử dụng).

Các chất tẩy trùng khác: Glutaraldehyd; hydrogen peroxid 3%; ethylen oxid.

Các tác nhân hóa trị liệu

Các tác nhân hóa trị liệu là các chất hóa học tác động chọn lọc trên sự tăng trưởng của vi sinh vật, tác động không đáng kể trên các chức năng của tế bào động vật chủ bị nhiễm (độc tính chọn lọc). Các tác nhân hóa trị liệu nói chung kiểm soát công hiệu các bệnh do vi khuẩn hơn bệnh do nấm, protozoa hoặc virus.

Các tác nhân tổng hợp: Sulfonamid, PAS, INH, Ethambutol

Kháng sinh

Kháng sinh là các phân tử hữu cơ có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp, có hoạt tính kháng vi khuẩn một cách chọn lọc, cho phép sử dụng tại chỗ hoặc hệ thống trên người hoặc động vật, là tác nhân hóa trị liệu để chữa trị các nhiễm khuẩn.

Kháng sinh ngăn nhiễm trùng do tác động trên đích làm chết mầm bệnh (đáp ứng diệt khuẩn) hoặc làm chậm sự tăng trưởng của chúng (đáp ứng kìm khuẩn).

Phân loại kháng sinh có thể theo cấu tạo hóa học, theo nguồn gốc sản xuất hay theo vị trí tác động chính trên vi khuẩn. Hình 3.10 trình bày phổ tác dụng của một số kháng sinh.

Phân loại kháng sinh theo vị trí tác động trên vi khuẩn

1. Ức chế tổng hợp/hủy thành tế bào:

- β-lactamin: Penicillin, Cephalosporin — Monobactam
- Fosfomycin — Carbapenem
- Glycopeptid (vancomycin) — Bacitracin, Cycloserin...

2. Ức chế tổng hợp/hủy màng tế bào:

Polypeptid: Polymicin

Nhóm kháng nấm polyen (Amphotericin B, Nystatin)

3. Ức chế tổng hợp acid nucleic:

- Quinolon — Nitrofurantoin
- Rifampicin — Nitroimidazol

4. Ức chế tổng hợp protein:

Aminoglycosid — Clindamycin

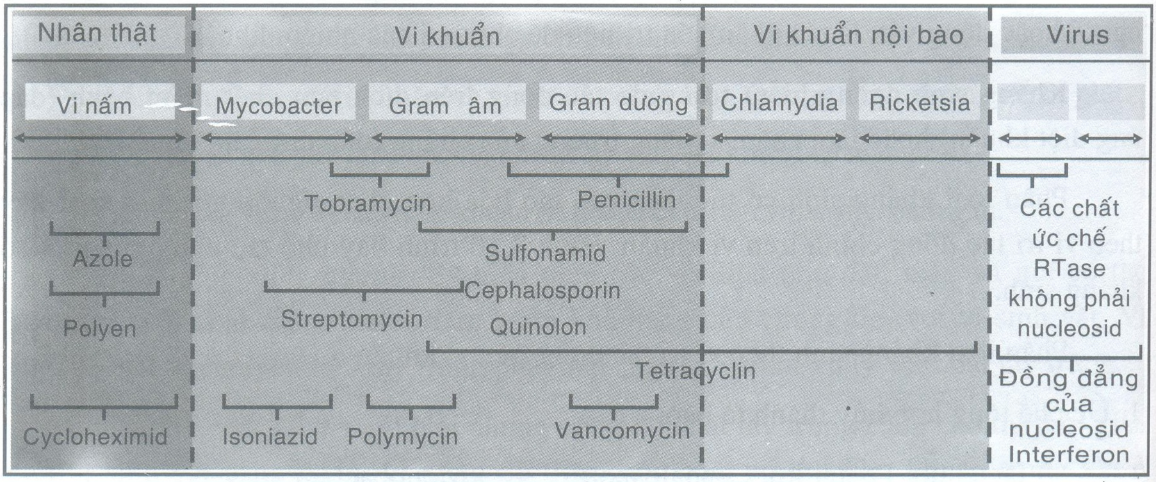
Tetracyclin — Spectinomycin

Chloramphenicol — Mupirocin

Erythromycin

5. Thay đổi chuyển hóa năng lượng:

Sulfonamid; Trimethoprim; Dapson; Isoniazid



Hình 3.10. Phổ tác dụng của một số kháng sinh

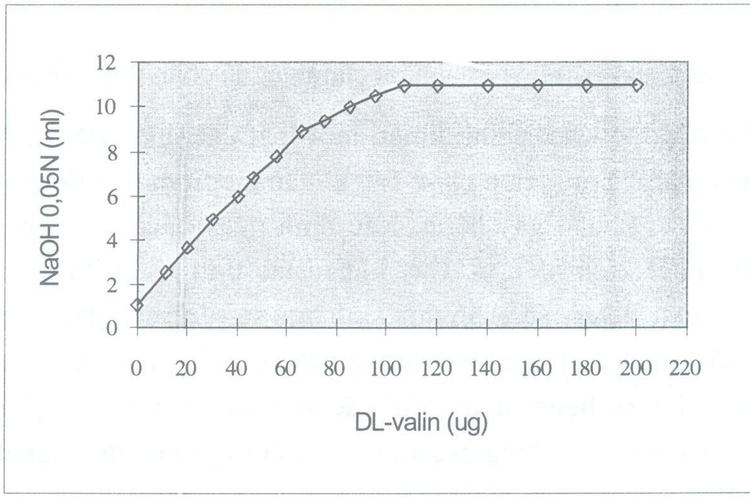
3.2. Sử dụng vi sinh vật trong định lượng

Vi sinh vật cần yếu tố tăng trưởng (vitamin, acid amin) cho sự tăng trưởng của chúng. Phương pháp sinh định lượng dựa vào nguyên tắc đơn giản là đo lượng các chất này được sử dụng bởi vi sinh vật. Chuẩn bị môi trường chứa các chất dinh dưỡng cần thiết cho tăng trưởng của vi khuẩn thử nghiệm ngoại trừ chất mà ta muốn định lượng. Khi không có chất này vi sinh vật không tăng trưởng. Nếu thêm chất này ở một lượng giới hạn, sự tăng trưởng của vi sinh vật thử nghiệm sẽ tỉ lệ với chất thêm vào.

* Bước 1: Đo mối liên hệ giữa số lượng tế bào tăng trưởng thu được và lượng chất thêm vào giới hạn, vẽ đường cong.

* Bước 2: Thêm vào môi trường cơ bản lượng khác nhau của nguyên liệu mà ta nghi ngờ có chứa chất tăng trưởng và đo lượng tế bào tăng trưởng xảy ra.

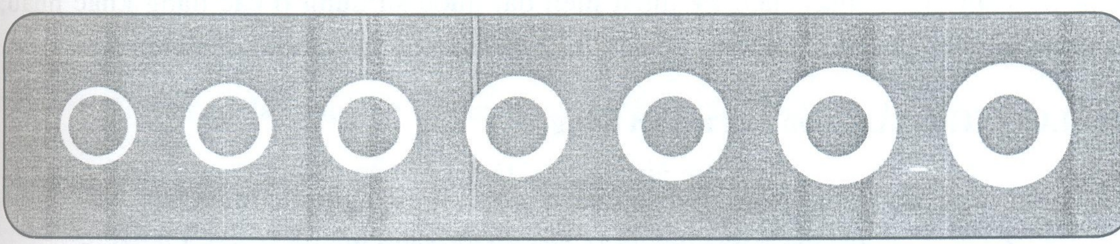
So sánh với đường cong chuẩn đã có ta biết lượng chất này trong nguyên liệu định lượng. Vi khuẩn lactic là vi sinh vật được dùng nhiều trong phương pháp sinh định lượng. Ta có thể định lượng đa số các acid amin, vitamin khác nhau với chỉ một vi sinh vật thử nghiệm. Trong trường hợp vi khuẩn lactic, sự tăng trưởng thường được đánh giá trực tiếp bằng định lượng acid lactic sản xuất (hình 3.11). Ưu điểm của các phương pháp này là chúng có thể được dùng để xác định lượng rất nhỏ acid amin - thấp xa lượng có thể định lượng bằng phương pháp hóa.



Hình 3.11. Đường cong sinh định lượng vi sinh vật cho acid lactic, valin

Đường cong thể hiện mối liên quan giữa lượng valin cung cấp và lượng kiềm cần để trung hòa acid tạo bởi vi sinh vật thử nghiệm (vi khuẩn lactic) như là kết quả của sự tăng trưởng.

Sinh định lượng cũng thường được dùng để định lượng kháng sinh bằng cách đo sự ức chế tăng trưởng chứ không phải sự tăng trưởng. Hình 3.12, là ví dụ định lượng kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật.



Hình 3.12. Sinh định lượng kháng sinh penicillin

Khay thạch dinh dưỡng chứa vi khuẩn thử, đặt các đĩa giấy tẩm lượng penicillin khác nhau lên. Lượng kháng sinh tăng từ 10 UI ở đĩa bên trái đến 10.000 UI ở đĩa phải. Từ vùng vi khuẩn bị ức chế ta có đường cong liên quan giữa nồng độ penicillin với bề rộng của sự ức chế.

3.3. Vi sinh vật là công cụ của sinh học

Vi sinh vật được các nhà khoa học sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các nguyên tắc cơ bản của sự sống. Khi nghiên cứu trên vi khuẩn, ta có thể bắt đầu với một tế bào đơn độc rồi nhân lên nhanh để có hàng tỉ tế bào tương tự nhau trong một ngày. Dân số các tế bào xác định này nghiên cứu dễ hơn nhiều dân số các tế bào hỗn hợp thu được từ mô động vật hoặc thực vật. Nhiều hiểu biết của chúng ta về các hoạt động sinh học là từ các nghiên cứu về vi khuẩn.

3.4. Nhận định vi khuẩn

Trong y tế, việc nhận định vi khuẩn rất cần thiết để chẩn đoán và điều trị kịp thời.

Khi đã thu được vi khuẩn tinh khiết, một loạt các thử nghiệm được làm để nhận định vi khuẩn phân lập. Trước tiên chọn các khuẩn lạc từ môi trường phân lập ban đầu gần giống nhất với vi khuẩn gây bệnh. Xác định ngay các đặc điểm về hình thái và nhuộm, kiểm tra dưới kính hiển vi. Cấy khuẩn lạc tinh khiết đó vào các môi trường chọn lọc và phân biệt. Bằng các phản ứng sinh hoá so sánh các đặc tính đã biết của các loại vi khuẩn khác nhau trên các môi trường này có thể xác định vi sinh vật gây bệnh nào đã được phân lập từ bệnh nhân. Khi các vi sinh vật cho các phản ứng sinh hóa tương tự nhau, đôi khi cần sử dụng các kháng thể chuyên biệt để nhận định chính xác.

Ngoài nhận định vi khuẩn gây bệnh, quan trọng là ta còn biết kháng sinh nào có thể sử dụng được để ức chế sự tăng trưởng của chúng. Thử độ nhạy cảm của kháng sinh thường được tiến hành đồng thời với các thử nghiệm nhận định. Thời gian cần để có các số liệu này là yếu tố quan trọng trong vi sinh lâm sàng vì nhận định vi khuẩn và thử độ nhạy cảm của kháng sinh là tiêu chuẩn đề nghị để chăm sóc bệnh nhân. Sử dụng các phương pháp truyền thống cần từ vài giờ đến vài ngày để hoàn tất các thử nghiệm nhận định. Ngày nay, kỹ thuật hiện đại được sử dụng ở các dạng khác nhau, cần thời gian ngắn cho các thông tin cần thiết để điều trị tối ưu cho bệnh nhân.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật quang tự dưỡng:

   a. Ánh sáng, CO_2

   b. Ánh sáng, chất hữu cơ

   c. Đều là chất hữu cơ

   d. Chất vô cơ, CO_2

   e. Chất vô cơ, chất hữu cơ

2. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật quang dị dưỡng:

   a. Ánh sáng, CO_2

   b. Ánh sáng, chất hữu cơ

   c. Chất vô cơ, CO_2

   d. Chất vô cơ, chất hữu cơ

   e. Đều là chất hữu cơ

3. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật dị dưỡng:

   a. Ánh sáng, CO_2

   b. Ánh sáng, chất hữu cơ

   c. Chất vô cơ, CO_2

   d. Chất vô cơ, chất hữu cơ

   e. Đều là chất hữu cơ

4. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật lithotrophic heterotroph:

a. Ánh sáng, CO_2

b. Ánh sáng, chất hữu cơ

c. Chất vô cơ, CO_2

d. Chất vô cơ, chất hữu cơ

e. Đều là chất hữu cơ

5. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật dị dưỡng tự dưỡng carbon:

a. Ánh sáng, CO_2

b. Ánh sáng, chất hữu cơ

c. Chất vô cơ, CO_2

d. Chất hữu cơ, CO_2

e. Đều là chất hữu cơ

6. Nguồn năng lượng và nguồn carbon của vi sinh vật hóa vô cơ tự dưỡng:

a. Ánh sáng, CO_2

b. Ánh sáng, chất hữu cơ

c. Chất vô cơ, CO_2

d. Chất hữu cơ, CO_2

e. Đều là chất hữu cơ

7. Vai trò của môi trường chọn lọc:

a. Kích thích vi khuẩn cần phân lập

b. Ngăn cản đa số loại vi khuẩn, ngoại trừ loại cần khảo sát

c. Làm cho vi khuẩn cần khảo sát có dạng riêng biệt

d. Kích thích vi khuẩn khác, ngăn cản vi khuẩn cần khảo sát

e. Tất cả

8. Yếu tố nào **không** ảnh hưởng đến tác động của chất tẩy trùng:

a. Thời gian

b. Nhiệt độ

c. Độ ẩm

d. Nồng độ chất tẩy trùng

e. Loài vi sinh vật

9. Để xác định tổng số vi khuẩn sống, người ta **không** dùng phương pháp:

a. Nhuộm và đếm bằng buồng đếm

b. Đếm số khuẩn lạc trên bản thạch

c. Định lượng oxy vi khuẩn hấp thu

d. Định lượng các sản phẩm vi khuẩn sinh ra

e. c và d

10. Ý nào **không** đúng trong pha tăng trưởng lũy thừa:

a. Mỗi tế bào phân chia thành 2 tế bào

b. Tế bào có trạng thái khỏe nhất

c. Tế bào lý tưởng để nghiên cứu về enzym và các thành phần khác

d. Lý tưởng để thử tác dụng của kháng sinh

e. Số tế bào mới sinh bằng số tế bào cũ chết

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
2. G. J. Tortora, B. R. Funke, C.L Case. ***Microbiology – An Introduction***. 6th edition, 1992, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bài 4

SỰ TRAO ĐỔI CHẤT CỦA VI SINH VẬT

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được quá trình hóa thẩm thấu ở vi khuẩn.*
2. *Trình bày được các con đường thu nhận năng lượng của vi khuẩn từ các quá trình phân giải đường hexose: EM, HMP, ED.*
3. *Biết được cách sử dụng các hợp chất glucid khác của vi khuẩn.*
4. *Phân biệt được hô hấp hiếu khí và kỵ khí.*
5. *Trả lời được thế nào là oxy hóa không hoàn toàn.*
6. *Kết nối được các quá trình lên men chủ yếu.*

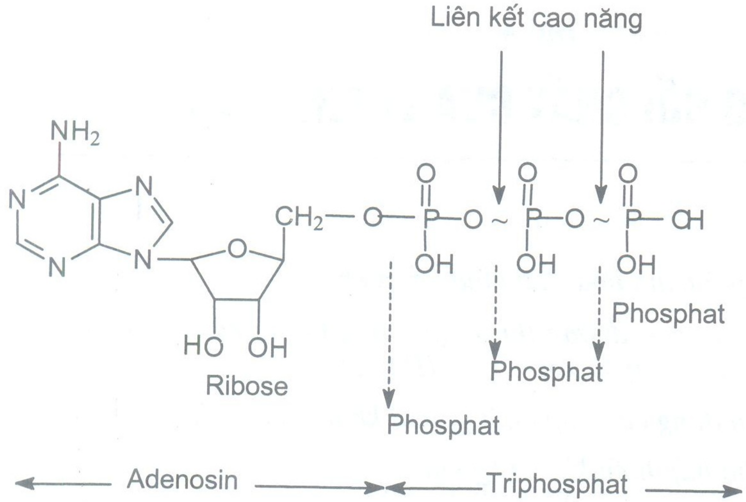
1. ĐẠI CƯƠNG

Vi sinh vật cũng như mọi cơ thể sống khác, trong lúc sinh trưởng, phát triển, cũng như ở trạng thái nghỉ đều cần phải có nguồn năng lượng liên tục cung cấp cho chúng. Năng lượng này thu nhận từ quá trình trao đổi chất. Các chất dinh dưỡng từ ngoài môi trường vào sẽ cung cấp năng lượng cho vi sinh vật. Trong các tế bào vi sinh vật, các chất dinh dưỡng trải qua sự biến đổi sâu sắc nhờ các phản ứng với sự tham gia của các loại enzym nhằm giải phóng năng lượng.

Những con đường trao đổi chất, xét đến cùng đều nhằm thực hiện hai chức năng: cung cấp "vật liệu" để xây dựng cơ thể và cung cấp năng lượng ở dạng thích hợp cho quá trình tổng hợp của tế bào và cho các quá trình cần năng lượng.

Năng lượng giải phóng từ các phản ứng oxy hóa sẽ được giữ lại trong một số hợp chất giàu năng lượng. Đó là các nucleotid triphosphat (ATP, UTP), các acylphosphat, các dẫn chất của acid carboxylic, thí dụ acetylcoenzym A. Hợp chất giàu năng lượng quan trọng nhất là ATP (adenosin triphosphat) (hình 4.1). Hợp chất này chứa hai liên kết cao năng (~). Năng lượng được phóng thích nhờ sự xúc tác, phá vỡ liên kết cao năng bởi enzym adenosin triphosphatase (ATPase). Một phân tử gam ATP giải phóng 7.300 calo khi một liên kết cao năng bị gãy (một mol ATP = 507 g).

ATP được coi như "tiền tệ năng lượng của tế bào", chúng được tiêu dùng trong tất cả các phản ứng trao đổi năng lượng. Các phân tử giàu năng lượng này được hình thành trong tế bào vi sinh vật. Có thể nói sự hình thành liên kết cao năng giữa P và O (còn gọi là quá trình phosphoryl hóa) là phương thức chủ yếu để tế bào vi sinh vật dự trữ năng lượng.



Adenosintriphosphat $\xrightarrow[\text{ATPase}]{H_2O}$ Adenosindiphosphat + Ion phosphat + 7300 cal/mol

Hình 4.1. Cấu trúc và hoạt tính của ATP

2. NĂNG LƯỢNG VÀ CÁC QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI ĐƯỜNG HEXOSE

2.1. Đường phân (glycolysis) hay con đường Embden - Meyerhof (EM), hay con đường fructose -1,6-diphosphat (FDP)

Từ năm 1871, M. M. Monaxein (Nga) đã chứng minh tính chất lên men được của quá trình chế tạo rượu. Năm 1897, hai anh em người Đức là E. Buchner và H. Buchner đã dùng dịch chiết từ tế bào nấm men để chủ động gây ra quá trình lên men rượu. Trong khoảng 25 năm đầu của thế kỷ XX, rất nhiều nhà sinh hóa đã góp phần làm sáng tỏ các giai đoạn của quá trình chuyển hóa đường thành rượu. Nổi bật nhất là những nghiên cứu của Gustav Embden và Otto Meyerhof. Quá trình này xảy ra trong tế bào chất của vi khuẩn đặc trưng cho Enterobacteriaceae bao gồm sự biến đổi glucose thành acid pyruvic.

Phương trình chung:

$$\text{Glucose} + 2\text{ATP} + 2\ \text{NAD} \rightleftharpoons 2CH_3COCOOH + 4\text{ATP} + 2\text{NADH}+H^+$$

Phản ứng đặc trưng của EM là phản ứng phân giải fructose -1,6-diphosphat nhờ enzym alldolase tạo ra 2 triosephosphat. Các triosephosphat này về sau chuyển hóa thành acid pyruvic. Trong quá trình này, mỗi triosephosphat tạo ra 2 phân tử ATP. Các phản ứng này được gọi là các phản ứng phosphoryl hóa ở mức cơ chất. Vì khi phân giải một phân tử glucose thành một phân tử fructose -1,6-diphosphat cần tiêu tốn 2 phân tử ATP, nên nhìn tổng quát khi chuyển hóa một phân tử glucose thành 2 phân tử acid pyruvic sẽ tạo được 2 phân tử ATP tương đương 7.300 calo × 2 = 14.600 calo/mol (hình 4.2).

Đường phân có thể coi là giai đoạn đầu, giai đoạn kỵ khí của hô hấp. Đây là quá trình cổ nhất trong chuỗi phản ứng dị hóa xảy ra ở các tế bào vi sinh vật, thực vật và động vật với các phản ứng cơ bản giống nhau, chỉ khác ở các phản ứng cuối.

Ở nấm men *Saccharomyces cerevisae*, sự lên men tạo sản phẩm cuối cùng là rượu. Ở một số vi khuẩn lên men lactic tạo acid lactic. Ở động vật sản phẩm cuối cùng là acid pyruvic và acid lactic.

2.2. Con đường hexosemonophosphat (HMP) hay là con đường oxy hóa pentophosphat (PP) hoặc con đường Warburg - Dicken, Horecker - Racker

Con đường EM là con đường chủ yếu, nhưng không phải là duy nhất, vì như vậy thì vi sinh vật không có đường ribose để tổng hợp ARN và không thể sử dụng được đường pentose hoặc các loại đường khác làm nguồn dinh dưỡng carbon.

Vào những năm 1940-1950, O. Warburg, F. Dickens, B. L. Horecker, E. Racker đã khám phá ra con đường phân giải glucid khác, ở đó không những bao gồm việc tạo thành hexosemonophosphat mà còn tạo ra glyceraldehyd -3-phosphat, và hợp chất này có thể theo con đường EM tạo pyruvat.

Phương trình chung:

$$\text{3 hexose-6-phosphat} + \text{6 NADP} \rightleftharpoons \text{2 hexose-6-phosphat} + \text{triose-3-phosphat} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + H^+$$

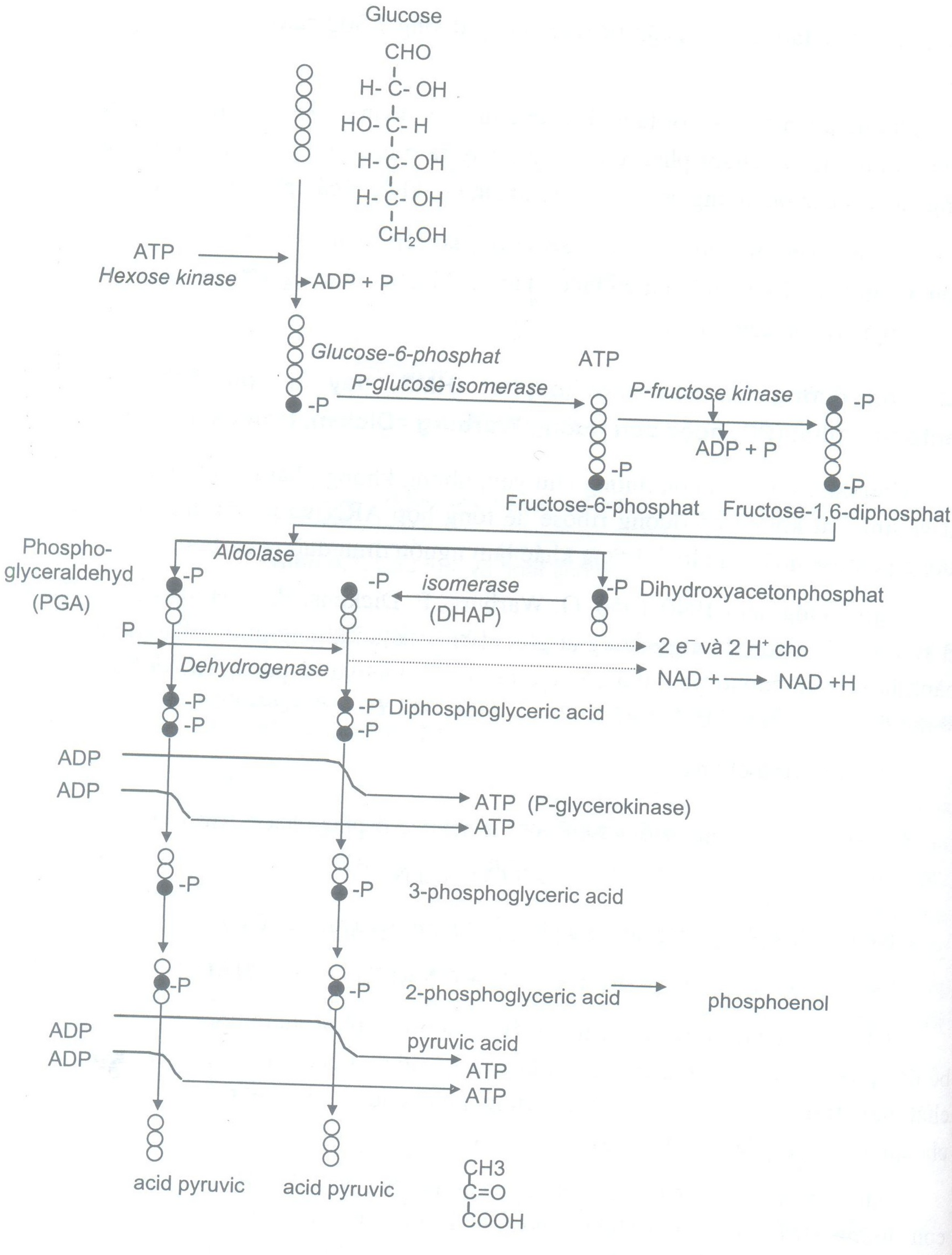
Nếu 3-phosphoglyceraldehyd chuyển thành pyruvat, ta sẽ có:

$$\text{Glucose} \rightarrow \text{pyruvat} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + H^+ + NADH + H^+ + ATP$$

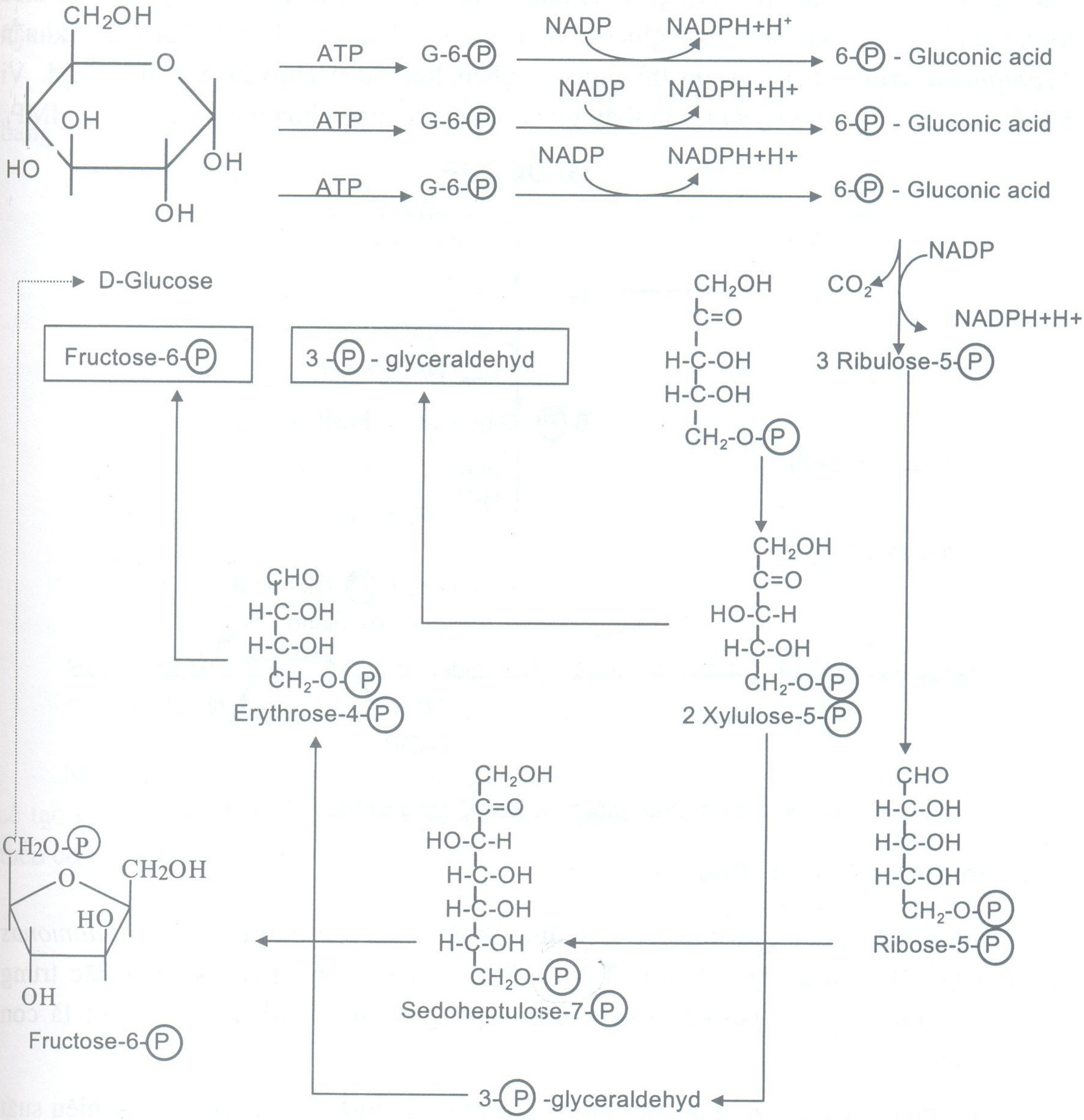
Khác với EM, trong chu trình HMP, glucose-6-phosphat không trải qua giai đoạn bẻ đôi phân tử tạo thành 2 triose mà bị oxy hóa thành các hợp chất 5 carbon. Các hợp chất này trải qua nhiều giai đoạn trung gian cuối cùng lại tạo thành glucose -6-phosphat và làm cho chu trình khép kín lại.

Từ sự phát hiện NADP. H $+H^+$ chứ không phải NADH $+H^+$ mà người ta cho rằng con đường HMP có những chức năng cơ bản như: bổ sung đường ribose cho tế bào, cung cấp NADP H $+H^+$, cần cho việc thực hiện các phản ứng sinh tổng hợp khử.

Hiệu suất năng lượng của con đường HMP chỉ bằng nửa con đường EM, vì khi biến đổi một phân tử đường glucose thành acid pyruvic thì chỉ tạo một phân tử ATP, do quá trình biến đổi 1 phân tử pentophosphat đến acid pyruvic.

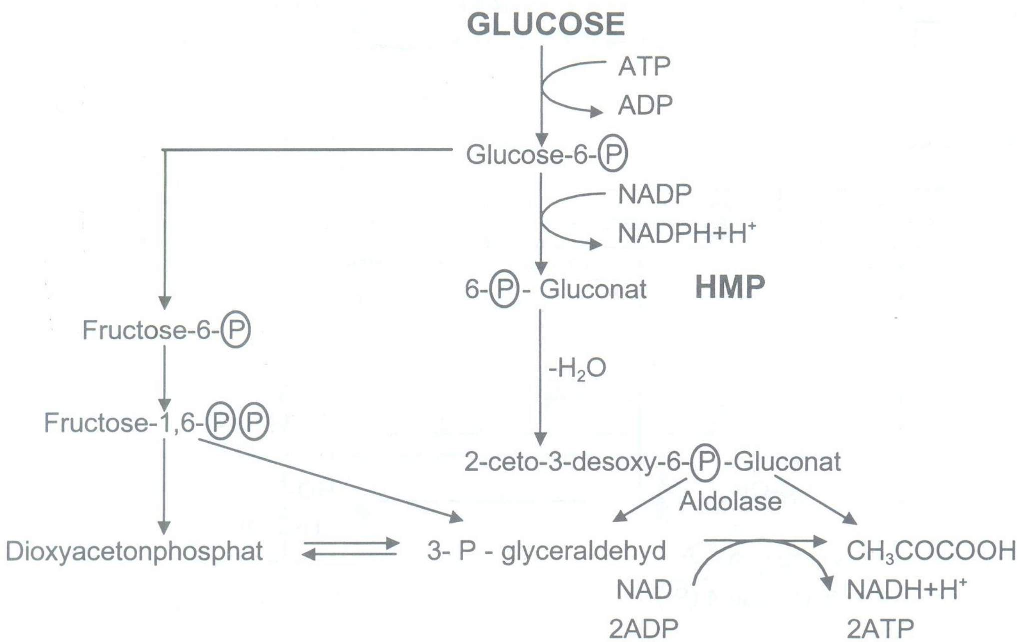


Hình 4.2. Sơ đồ con đường đường phân (Embden - Meyerhof)



Hình 4.3. Sơ đồ con đường hexosemonophosphat (HMP)

Ở nhiều vi sinh vật, EM và HMP là những con đường phổ biến và bổ sung cho nhau, cùng phát huy tác dụng trong tế bào. Tỷ lệ giữa hai con đường này trong quá trình trao đổi chất thường khác nhau tùy thuộc vào nhóm vi sinh vật. Ví dụ trong hoạt động sống của nấm *Penicillium chrysogenum* có khoảng 2/3 số lượng glucose được chuyển hóa qua con đường HMP, trong khi đó đối với *E. coli* thường chỉ có 1/3 glucose được chuyển hóa qua HMP. Đối với *Saccharomyces cerevisiae* trong điều kiện lên men kỵ khí hầu như toàn bộ glucose được chuyển hóa theo EM, trong khi đó ở điều kiện hiếu khí sẽ có khoảng 30% glucose được chuyển hóa theo HMP. Đối với vi khuẩn *Propionibacterium arabinosum* thì glucose phần lớn được chuyển hóa theo EM. Vi khuẩn *Acetobacter suboxydans* chỉ thấy glucose được chuyển hóa theo con đường HMP.



Hình 4.4. Sơ đồ phân giải theo con đường Entner - Doudoroff

2.3. Con đường Entner -Doudoroff (ED)

Con đường phân giải hexose này được khám phá lần đầu tiên ở *Pseudomonas saccharophila* (Entner N., Doudorff M., 1952). Vì sản phẩm trung gian đặc trưng cho quá trình này là 2-ceto-3-desoxy-6-phosphogluconic acid, nên còn gọi là con đường CDPG.

Một phân tử glucose qua con đường ED chỉ tạo được một ATP, vì vậy hiệu suất năng lượng của con đường này cũng chỉ khoảng 25%.

Ta biết từ 3-phosphoglyceraldehyd biến thành acid pyruvic tạo ra 2 ATP, nhưng vì từ glucose biến thành glucose -6-phosphat đã tiêu hao 1 ATP nên toàn bộ con đường ED tạo được 1 ATP.

Con đường ED được một số vi sinh vật chủ yếu là giống Pseudomonas thực hiện. Vì vậy có tác giả (Deley I, 1962) cho rằng đây là một nhánh tiến hóa độc lập.

Phương trình chung:

$$Glucose + ATP + NADP + NAD \rightleftharpoons 2\ CH_3COCOOH + 2\ ATP + NADPH{+}H^+ + DH{+}H^+$$

Người ta thấy con đường ED có ở: Azotobacter, Xanthomonas, Streptococcus và *Zymomonas mobilis*.

Có thể phân biệt hai con đường phân giải đường hexose của một số vi khuẩn theo bảng 4.1.

***Bảng 4.1.** Sự ưu tiên giữa con đường chuyển hóa đường ở một số vi sinh vật*

Vi khuẩn	EM	ED
Arthrobacter sp	+	-
Azotobacter chroococcum	+	-
Alcaligenes eutrophus	-	+
Bacillus subtilis, B. cereus	+	-
E. coli và vi khuẩn đường ruột khác	+	-
Pseudomonas saccharophilla, P. fluorescens	-	+
Rhizobium japonicum	-	+
Thiobacillus intermedius, T. ferroxidans	-	+
Xanthomonas phaesoli	-	+

Con đường ED phổ biến ở vi khuẩn Gram âm và ít gặp ở vi khuẩn kỵ khí.

Nếu chuyển *E. coli* từ môi trường glucose sang môi trường gluconat thì vi khuẩn sẽ tạo enzym gluconokinase phosphoryl hóa gluconat thành 6-P-gluconat và tiếp tục theo con đường ED:

$$\text{Glucose} \rightarrow \text{G-6-P} \rightarrow \text{EM}$$

$$\text{Gluconat} \rightarrow \text{6-P-Gluconat} \rightarrow \text{ED}$$

Do đó, nhiều Pseudomonas phân giải glucose qua gluconat. Thí dụ, *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, P. putila* vì chúng có chứa enzym glucodehydrogenase biến glucose thành gluconat.

Mối liên hệ tương hỗ giữa các con đường phân giải glucose được minh họa trong hình 4.5.

2.4. Vi sinh vật sử dụng các hợp chất glucid khác

Vi sinh vật còn có khả năng sử dụng nhiều loại đường khác ngoài glucose.

Quá trình phân giải monosaccharid đều bắt đầu từ việc phosphoryl hóa cũng như glucose.

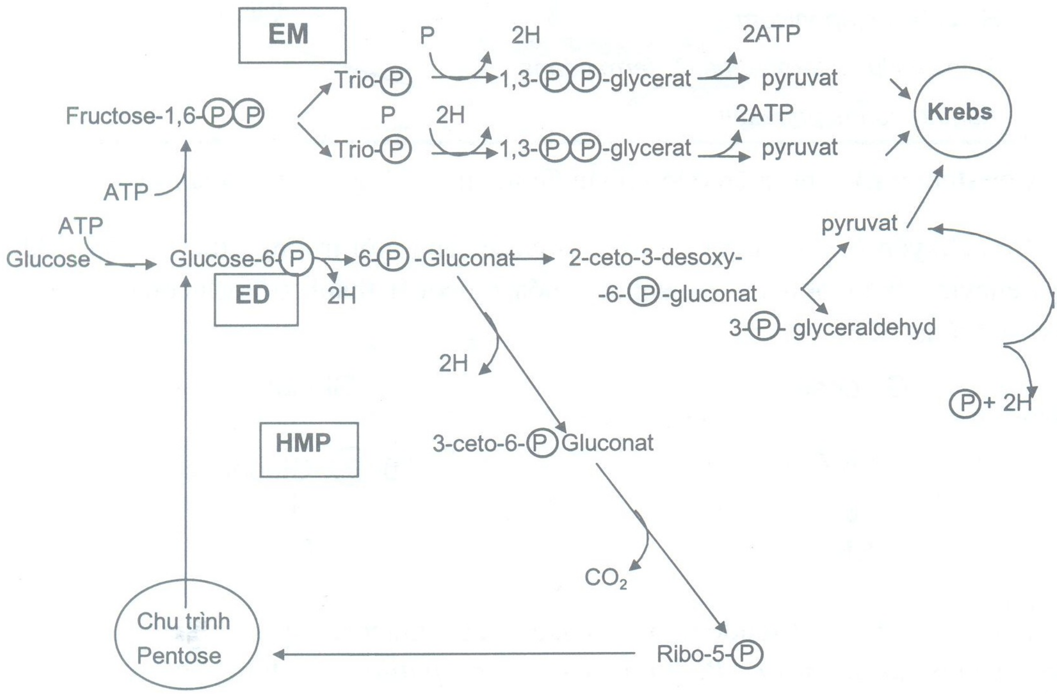
Fructose sau khi phosphoryl hóa sẽ đi ngay vào EM:

$$\text{Fructose} \xrightarrow{\text{Phosphoryl hóa}} \text{Fructose-1,6-diphosphat} \longrightarrow \text{EM}$$

$$\text{Mannose} \xrightarrow[\text{Mannose kinase}]{\text{Phosphoryl hóa}} \text{Mannose-6-phosphat} \xrightarrow[\text{isomerase}]{\text{Manose phosphat}} \text{Fructose-6- phosphat}$$

$$\text{Galactose} \xrightarrow[\text{Galactose kinase}]{\text{Phosphoryl hóa}} \text{Galactose-1-phosphat} \xrightarrow{\text{Transferase}} \text{Glucose-1-phosphat}$$

$$\xrightarrow{\text{Phosphoglucose mutase}} \text{Glucose-6-phosphat} \longrightarrow \text{ED, EM}$$



Hình 4.5. Mối liên hệ tương hỗ giữa các con đường phân giải glucose

Đối với polysacharid thì phải trải qua quá trình thủy phân để tạo monosacharid.

$$\text{Oligosaccharid} \xrightarrow[\text{ngoại bào}]{\text{Thủy phân}} \text{Các monosaccharid}$$

Lactobacillus và *Neisseria meningitidis* có chứa enzym malto -phosphorylase, có khả năng sử dụng disaccharid mà không tiêu tốn ATP.

$$\text{Maltose} + H_3PO_4 \rightleftharpoons \text{Glucose-1-phosphat} + \text{Glucose}$$

3. HÔ HẤP

3.1. Hô hấp hiếu khí và chu trình acid tricarboxylic (Krebs)

Acid pyruvic sau khi được hình thành bằng một trong các con đường phân giải carbohydrat sẽ được rất nhiều vi sinh vật oxy hóa triệt để thông qua chu trình Krebs hay còn gọi là chu trình acid tricarboxylic (ATC).

Acid pyruvic trước khi tham gia vào ATC được oxy hóa thành acetylcoenzym A theo phương trình:

$$CH_3COCOOH + CoASH + NAD \rightarrow CH_3CO{\sim}CoASH + NADH{+}H^+ + CO_2$$

Tham gia vào phản ứng này ngoài CoASH và NAD còn có thiamin - pyrophosphat (TPP), acid lipoic và Mg^{2+}.

Hydro được giải phóng ra trong chu trình Krebs sẽ được kết hợp với codehydroxygenase, sau đó sẽ được chuyển qua chuỗi cytochrom để kết hợp với oxy tạo H_2O.

Mỗi lần coenzym NAD lấy $2H^+$ của cơ chất biến thành $NADH + H^+$ nghĩa là ta có $2H^+$ và $2e^-$. Các proton và electron này sẽ chuyển qua các hệ thống enzym.

$$\underset{}{\text{Cơ chất}} \rightarrow \underset{-0{,}32\text{ V}}{NAD} \rightarrow \underset{-0{,}12}{FMN} \rightarrow \underset{-0{,}07}{CoQ} \rightarrow \underset{+0{,}02}{Cyt_b} \rightarrow \underset{+0{,}22}{Cyt_{c1}} \rightarrow \underset{+0{,}22}{Cyt_c} \rightarrow \underset{+0{,}34}{Cyt_{(a+a2)a3}} \rightarrow \underset{+0{,}82\text{ V}}{O_2}$$

Tổng kết năng lượng sản xuất:

Phosphoryl hóa ở mức cơ chất	EM	2 ATP	
	Krebs	2 ATP	
Phosphoryl hóa ở dãy hô hấp	EM	$2\ NADH{+}H^+ \times 3 \rightarrow$	6 ATP
	Krebs	$8\ NADH{+}H^+ \times 3 \rightarrow$	24 ATP
		$2\ FADH{+}H^+ \times 2 \rightarrow$	4 ATP
			38 ATP

Phương trình tổng quát:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 + 38\ ADP + 38P \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 38\ ATP$$

Năng lượng giải phóng ra dần dần từng lượng nhỏ, tích lũy trong ATP:

$$\text{Năng lượng} + ADP \rightarrow ATP$$

Chu trình Krebs gồm 9 phản ứng liên tiếp để hoàn thành việc tách tất cả H ra khỏi acid pyruvic, còn gọi là phosphoryl hóa oxy hóa (hình 4.6). Ở đây, nhờ một loạt các enzym tác động liên tiếp, mỗi enzym thực hiện một phần nhỏ quá trình phân hủy. Acid pyruvic chuyển thành acetyl CoA, rồi cuối cùng phân hủy thành 2 CO_2 và 8 H^+.

Chất nhận điện tử cuối cùng của chuỗi điện tử (còn gọi là chuỗi hô hấp) là oxy phân tử. Phản ứng liên kết hydro với oxy phân tử xảy ra dưới sự xúc tác của cytochrom oxydase (cytochrom a_3).

$$4\ Fe^{2+} + 4\ H^+ + O_2 \rightarrow 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O$$

Chuỗi điện tử này đặc trưng cho phần lớn các vi sinh vật, nhưng ở vi khuẩn, người ta nhận thấy có thể ngắn hơn, số lượng các chất chuyển điện tử có thể ít hơn, chẳng hạn ở *E. coli* và *Proteus vulgaris* không chứa cytochrom c.

3.2. Hô hấp kỵ khí

Hô hấp kỵ khí là hô hấp mà chất nhận điện tử cuối cùng không phải là oxy.

Chất nhận là nitrat thì gọi là hô hấp nitrat (kỵ khí không bắt buộc).

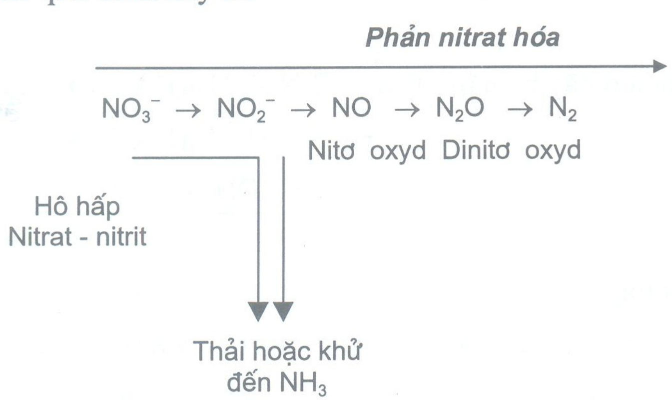
Chất nhận điện tử là sulfat thì gọi là hô hấp sulfat (kỵ khí bắt buộc).

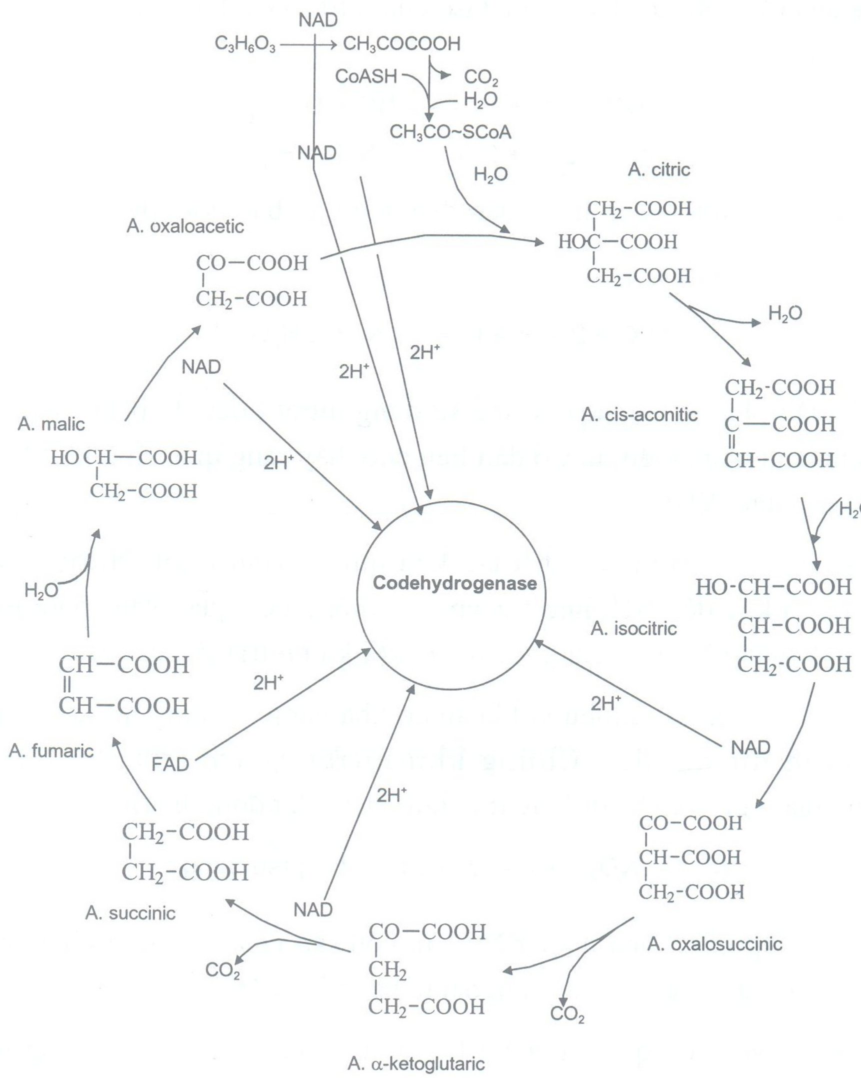
Có một ít trường hợp hô hấp kỵ khí mà chất nhận điện tử độc nhất là acid carbonic, ví dụ ở *Clostridium aceticum* oxy hóa hydro phân tử theo phương trình:

$$4\ H_2 + 2\ CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O$$

Hô hấp nitrat

Hô hấp nitrat bao gồm hai loại quá trình: hô hấp nitrat - nitrit và phản nitrat hóa. Sơ đồ chung của hai quá trình này là:





Hình 4.6. Sơ đồ chu trình Krebs

Quá trình khử nitrat (phản nitrat) đến nitơ phân tử xảy ra qua hàng loạt giai đoạn trung gian:

$$2\ HNO_3 \xrightarrow[+2\ H]{-O_2} 2\ HNO_2 \longrightarrow :$$

Nitrat reductase (nitratase) là enzym màng có chứa Mo, khử nitrat đến nitrit:

$$NO_3^- + 2\ e^- + 2H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

Nitrit reductase (nitritase) và reductase của nitơ oxyd được phát hiện như những enzym thủy phân:

$$NO_2^- + e^- + H^+ \longrightarrow NO + OH^-$$

$$2\ NO + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow N_2O + H_2O$$

Reductase của dinitơ oxyd liên quan đến màng tế bào, khử dinitơ oxyd đến nitơ phân tử:

$$N_2O + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow N_2 + 2\ H_2O$$

Các vi khuẩn phản nitrat hoá có thể sử dụng nitrat hoặc đa phần sử dụng nitrit, NO và N_2O làm chất nhận điện tử. Có dẫn liệu cho thấy rằng quá trình khử NO_2^- thành N_2O kèm theo việc tạo ATP.

Các vi khuẩn hô hấp nitrat-nitrit chỉ khử nitrat thành nitrit. Nitrit được thải ra môi trường hoặc bị khử đến NH_3 nhờ các enzym không liên quan đến chuỗi hô hấp. Vì vậy, ở những vi khuẩn này ATP chỉ được tạo ra khi khử nitrat thành nitrit.

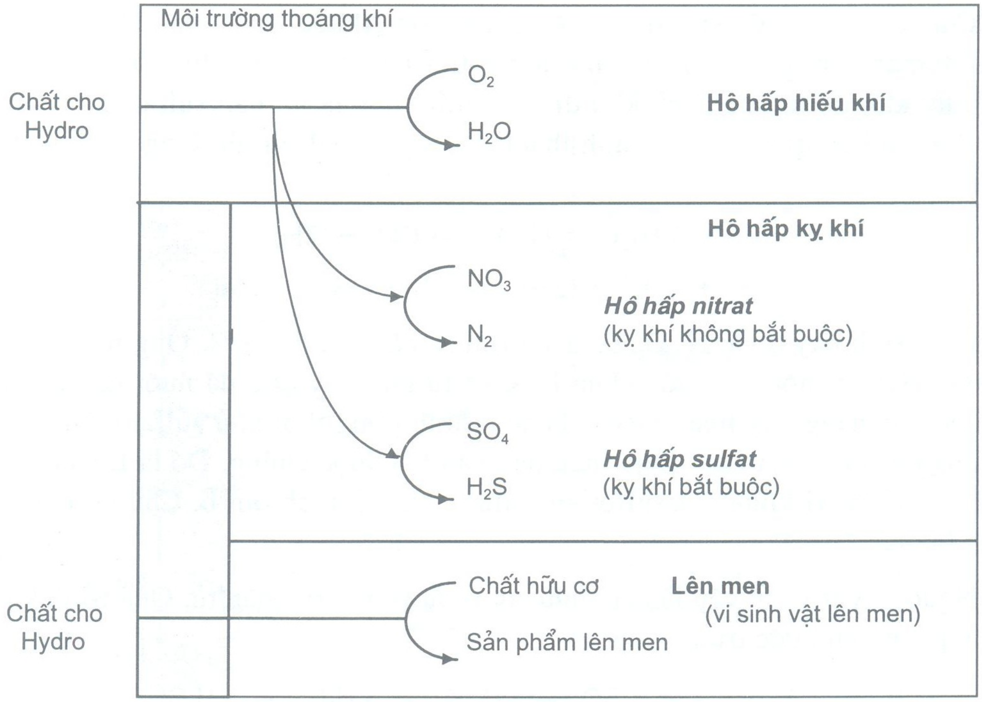
Khác với hô hấp nitrat, nhiều vi khuẩn có khả năng sử dụng nitrat (nitrat hóa) làm nguồn dinh dưỡng nitơ. Chúng khử nitrat qua nitrit đến NH_3, sau đó NH_3 sẽ tiếp tục tham gia vào hoạt động trao đổi chất (khử đồng hóa).

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow X \rightarrow NH_2OH \rightarrow NH_4 \text{ (sử dụng)}$$

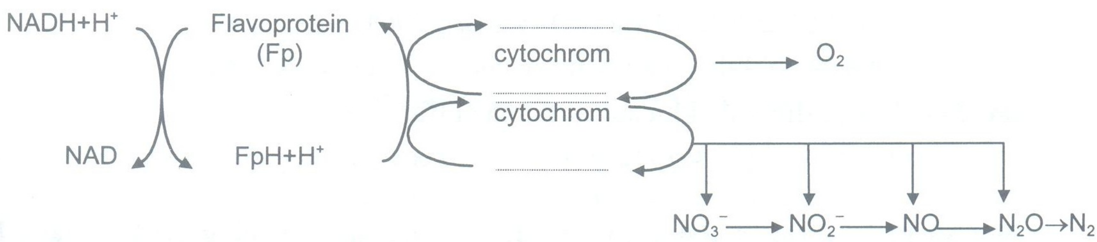
Sản phẩm trong nitrat hóa được dùng lại, còn sản phẩm trong hô hấp nitrat (khử dị hóa) không được sử dụng mà thải ra ngoài tế bào vi khuẩn.

Hệ thống enzym của quá trình hô hấp nitrat chỉ được tạo ra trong điều kiện không có hoặc thiếu oxi. Trong trường hợp này, chúng sẽ oxy hoá chất hữu cơ bằng oxy của nitrat và khử nitrat thành nitơ phân tử. Ngược lại, trong điều kiện có oxy thì thường những vi khuẩn này lại chuộng oxy (O_2) hơn, chính vì vậy mà chúng thuộc loại kỵ khí không bắt buộc (hình 4.7).

Ví dụ, *Bacillus licheniformis* trong môi trường glucose và có oxy thì glucose bị phân giải theo EM và Acetyl CoA được oxy hóa trong chu trình Krebs và $NADH_2$, $FADH_2$ sẽ đi vào chuỗi hô hấp. Nếu không có oxy mà có nitrat thì nitrat sẽ thay thế oxy làm chất nhận điện tử. Song nitrat không đơn thuần thay thế oxy, mà trong quá trình phản nitrat hóa sẽ tạo ra một hệ thống cytochrom đặc biệt có liên quan đến hệ thống enzym màng, chúng sẽ khử nitrat đến nitrit và sau đó tạo ra nitơ phân tử. Dòng điện tử sẽ được chuyển qua hệ thống cytochrom và cuối cùng qua 4 giai đoạn khử.



Hình 4.7. Tóm tắt các phương thức hô hấp ở vi sinh vật



Nhóm vi sinh vật có khả năng thực hiện quá trình phản nitrat hóa được gọi là vi khuẩn phản nitrat hóa. Những loài điển hình gồm có: Pseudomonas denitrificans, P. aeruginosa, P. stutzeri, P. fluorescens, Micrococcus denitrificans, Bacillus licheniformis, Achromobacter severnii, ...

Khi phân giải nitrat, trong môi trường sẽ tích lũy lại một số gốc kiềm (K, Na, Ca). Các gốc kiềm này sẽ sinh ra KOH, NaOH hoặc carbonat, do đó quá trình phản nitrat hóa bao giờ cũng dẫn việc làm kiềm hóa môi trường.

Hô hấp sulfat (lên men sulfat)

Phần lớn các loài thực vật và vi sinh vật có khả năng đồng hóa sulfat và dùng chúng làm nguồn dinh dưỡng lưu huỳnh để tổng hợp ra acid amin và các enzym chứa lưu huỳnh. Quá trình này được gọi là quá trình khử đồng hóa sulfat.

Chỉ có một số vi sinh vật, phần lớn thuộc hai chi Desulfovibrio và Desulfotomaculum có khả năng sử dụng sulfat làm chất nhận hydro cuối cùng trong hô hấp kỵ khí, đó là quá trình khử dị hóa sulfat hay là hô hấp sulfat (hình 4.8). Việc khử sulfat có liên quan đến sự hình thành các dạng hydro linh động khi oxy hoá chất hữu cơ:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \longrightarrow CO_2 + (2H)$$

$$H^+ + SO_4^{2-} + (2H) \longrightarrow H_2O + H_2S + kcal$$

Quá trình này được N. D. Zelinski tìm ra năm 1890-1893. Ông nhận thấy ở đáy biển Hắc Hải có một lớp nước chứa H_2S, và từ bùn này ông đã nuôi cấy được loài vi khuẩn có khả năng oxy hóa glucose hoặc tartrat, đồng thời khử sulfat thành H_2S. Năm 1895 nhà khoa học Hà Lan Beijerinck đã phân lập được chúng. Đó là Desulfovibrio có cytochrom c_3 và vi khuẩn Desulfotomaculum chứa cytochrom b. Chúng thuộc loại kỵ khí bắt buộc.

Nguồn hydro chủ yếu là acid hữu cơ, rượu và hydro phân tử. Quá trình khử sulfat diễn ra qua nhiều bước trung gian:

$$H_2SO_4 \longrightarrow H_2SO_3 \longrightarrow H_2SO_2 \longrightarrow H_2SO \longrightarrow H_2S$$

Cơ chất hữu cơ thường không được oxy hóa triệt để. Sản phẩm cuối cùng của quá trình oxy hóa thường là acid acetic. Thí dụ:

$$\underset{\text{(acid lactic)}}{2\,CH_3CHOHCOOH} + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2 + 8\,H;$$

sau đó 8H được dùng để khử sulfat thành sulfit:

$$SO_4^{2-} + 8\,H \longrightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$$

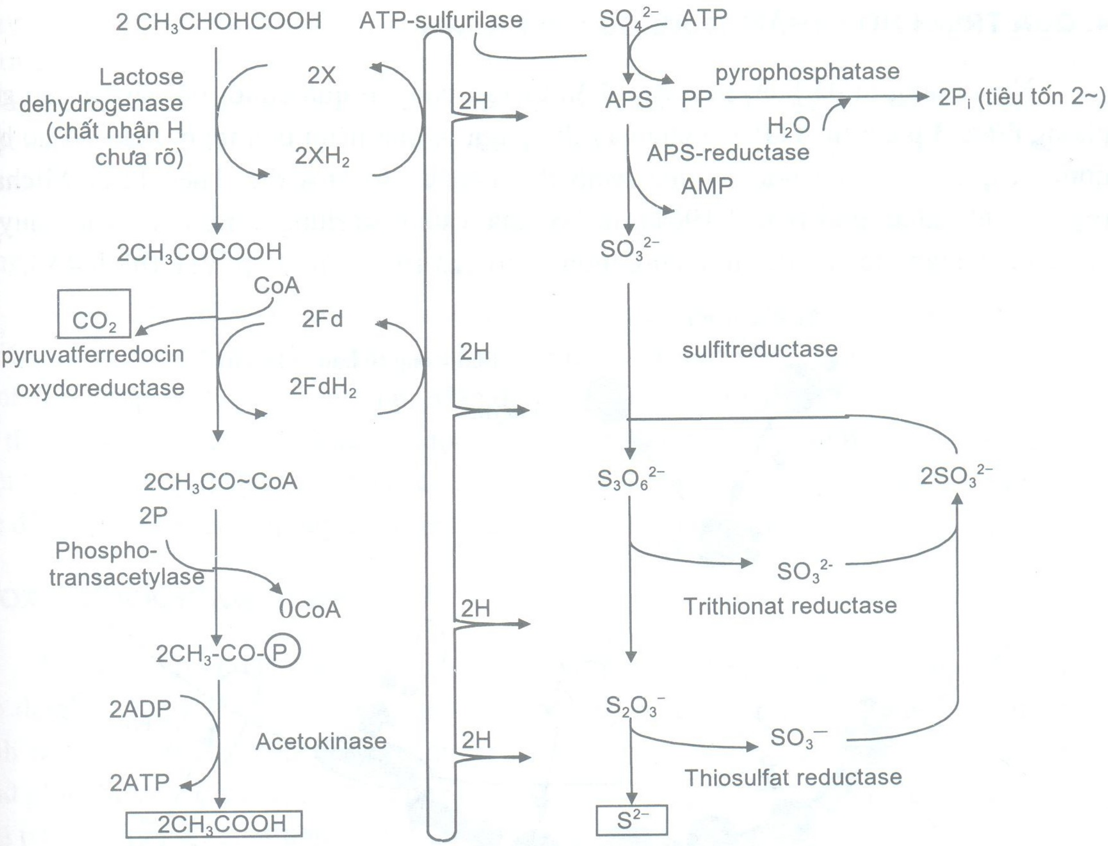
Một số loài vi khuẩn thuộc loại tự dưỡng hóa năng. Chúng có khả năng khử sulfat bằng hydro phân tử và sử dụng năng lượng sinh ra trong quá trình này để đồng hóa CO_2 của không khí.

$$4\,H_2 + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{vi khuẩn}} H_2S + 4\,H_2O + xKcal$$

Trao đổi chất ở những vi khuẩn khử sulfat có tính chất oxy hóa, chúng nhận năng lượng nhờ quá trình phosphoryl hóa trong chuỗi hô hấp. Quá trình khử sulfat xảy ra trong tế bào những vi sinh vật này được bắt đầu bằng việc hoạt hóa sulfat, đây là quá trình cần năng lượng.

Dưới tác dụng của ATP -sulfurilase, gốc phosphat của ATP được thay bằng sulfat và tạo thành adenosin -5'-phosphosulfat (APS).

$$ATP + SO_4^{2-} \longrightarrow \text{Adenosin-5'-phosphosulfat} + \text{pyrophosphat}$$



Hình 4.8. Sơ đồ dị hóa sulfat của vi khuẩn phản sulfat hóa lấy nguồn hydro từ sự lên men acid lactic

Pyrophosphat (PP) bị phân giải nhờ enzym pyrophosphatase. Sau đó xảy ra quá trình khử Adenosin –5' - phosphosulfat (APS) với sự tạo ra sulfat và AMP (Adenosin monophosphat). Trong quá trình khử sulfat phải có sự tham gia của cytochrom c_3.

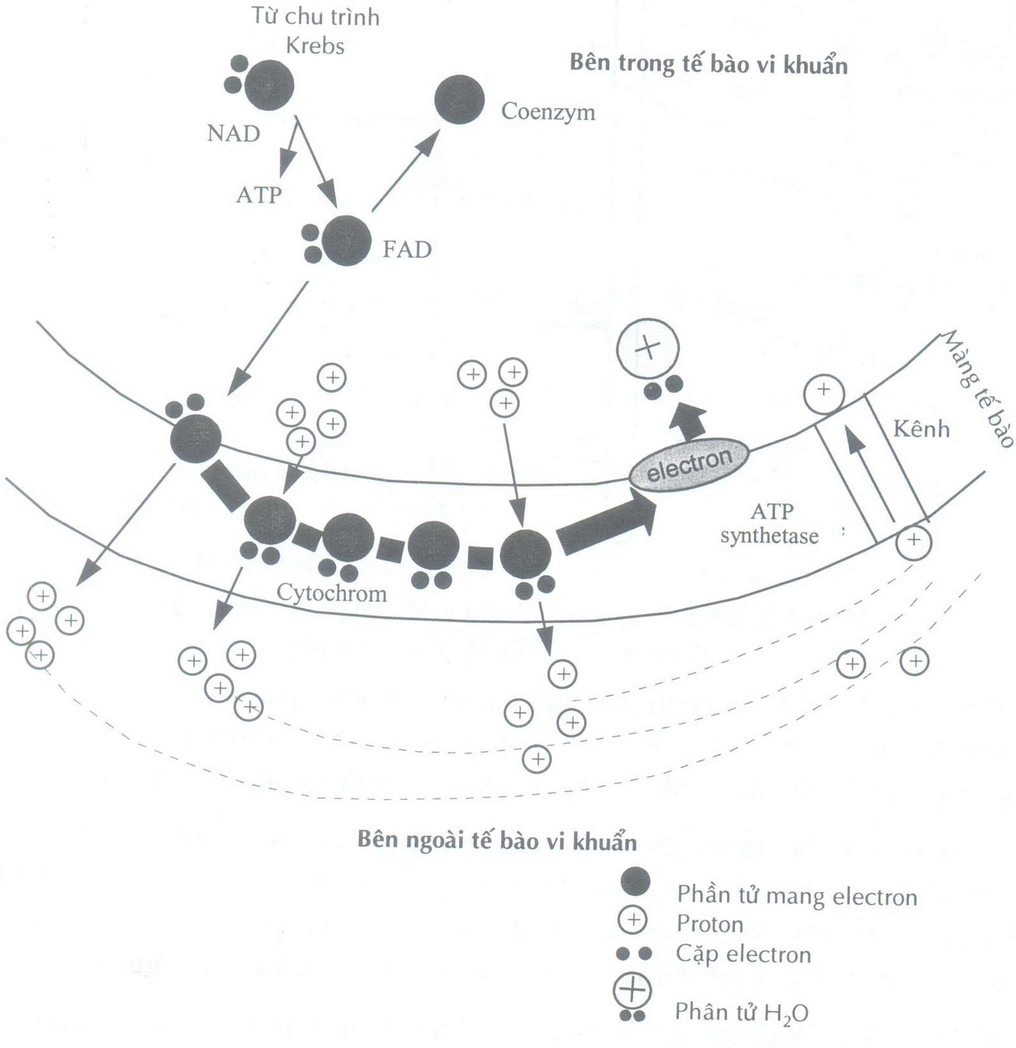
Về mặt năng lượng: ta thấy, oxy hóa một mol acid lactic thu được 2 mol ATP; song mặt khác khi khử sulfat thành sulfit thì lại phải dùng 2 liên kết cao năng (ATP → AMP + PP_i). Như vậy, tổng năng lượng bằng 0. Vì thế mà nhiều vi khuẩn phản sulfat hóa có thể sử dụng H_2 và tạo sulfit từ sulfat và H_2 mà không cần thông qua APS.

Vi khuẩn phản sulfat hóa thường gặp ở những vùng bùn lầy có khí H_2S, tức là nơi có quá trình phân giải kỵ khí các hợp chất hữu cơ. Những vi khuẩn này đã tham gia tích cực vào quá trình hình thành quặng lưu huỳnh, hình thành các mỏ dầu. Desulfovibrio có khả năng sử dụng các sản phẩm phân giải dở dang của carbon như acid béo, oxyacid, rượu và hydro để sinh ra hydrocarbur.

Desulfotomaculum ruminus tham gia tích cực vào quá trình khử sulfat và tạo H_2S trong dạ cỏ của các động vật nhai lại như trâu, bò ...

4. QUÁ TRÌNH HÓA THẨM THẤU CỦA VI KHUẨN

Như chúng ta đã biết, một cặp điện tử vận chuyển qua chuỗi hô hấp tế bào giải phóng được 3 phân tử ATP. Cơ chế này được gọi là quá trình hóa thẩm thấu, vì nó bao gồm cả quá trình hóa học và quá trình thẩm thấu ("*osmosis*"). Theo Piter Michael (người Anh, nhận giải Nobel 1961) thì hóa thẩm thấu sử dụng công năng vận chuyển proton qua màng tế bào để sinh năng lượng cho quá trình tổng hợp ATP (hình 4.9).



Hình 4.9. Quá trình hóa thẩm thấu tạo năng lượng ở vi khuẩn

Trong quá trình hóa thẩm thấu, electron chuyển động qua các coezym và cytochrom, năng lượng hữu dụng được giải phóng tại ba điểm vận chuyển. Năng lượng cung cấp cho các proton nhảy từ bên trong nguyên sinh chất vi khuẩn qua màng tế bào ra ngoài màng. Năng lượng này được gọi là "*lực kích động proton*". Không bao lâu, một lượng lớn proton sẽ được tích tụ bên ngoài màng tế bào, và vì chúng không dễ dàng gì quay lại bên trong, cho nên tập trung một thế năng lớn. Do proton tích điện dương nên phía ngoài màng tế bào tích diện dương và tạo ra sự chênh lệch điện hóa. Bỗng nhiên hàng loạt kênh mở ra và proton chảy ngược vào. Mỗi kênh hiện diện như một lỗ protein (protein pore) nối liền với các phần tử của phức hợp enzym gọi là ATP - synthetase. Phức enzym này hình thành nên những điểm gắn của ATP và ADP. Như vậy các proton vọt qua lỗ, giải phóng năng lượng và năng lượng này được sử dụng để tổng hợp ATP từ ADP và ion phosphat.

Hóa thẩm thấu chỉ xảy ra trong những màng tế bào còn cấu trúc nguyên vẹn. Dĩ nhiên, nếu màng bị tổn thương thì sự vận chuyển proton sẽ không thể xảy ra, và quá trình tổng hợp ATP sẽ bị dừng lại. Mặc dù electron có thể vẫn tiếp tục vận chuyển qua hệ thống cytochrom. ATP không được tổng hợp thì cơ thể nhanh chóng bị chết. Đây là một trong những nguyên nhân vì sao sự tổn thương màng tế bào vi khuẩn, ví dụ như do tác động của kháng sinh hay chất tiệt trùng, lại có hại cho vi khuẩn.

5. OXY HÓA KHÔNG HOÀN TOÀN

Khi oxy hóa hoàn toàn, vi sinh vật hiếu khí thực hiện oxy hóa chất dinh dưỡng tạo thành CO_2 và H_2O; còn trong trường hợp oxy hóa không hoàn toàn, thì sản phẩm sinh ra là những hợp chất hữu cơ được oxy hóa một phần như: cetoacid, acid acetic, acid gluconic, acid fumaric, acid citric, acid lactic, ... giống như sản phẩm của một số quá trình lên men nên được gọi là "*lên men oxy hóa*".

5.1. Vi khuẩn acetic và sự tạo thành acid acetic

Thông qua con đường oxy hóa không hoàn toàn, vi sinh vật phân giải đường hoặc rượu cho ra acid acetic. Vi khuẩn acetic là vi khuẩn Gram âm, có chu mao như Acetobacter, thường thấy trên bề mặt thực vật, là loại hiếu khí bắt buộc; hoặc có tiêm mao phân bố ở cực như Acetomonas (còn gọi là Gluconobacter). Trong 20 loài thuộc chi Acetobacter lên men acetic có các loài quan trọng nhất là *A. aceti, A. pasteurianum, A. orleanense, A. xylinum, A. schiitzenbachii*. Những vi khuẩn này phân biệt nhau bởi kích thước tế bào, chịu cồn, khả năng tích lũy acid acetic trong môi trường, ...Ví dụ, *A. aceti* tích lũy đến 6% acid acetic, *A. orleanense* – 9,5%, *A. schiitzenbachii* – 11,5%, còn *A. xylinum* – 4,5%, *A. aceti* và *A. schiitzenbachii* chịu được nồng độ rượu đến 9-11%, còn *A. xylinum* chỉ chịu được 5-7%.

Quá trình biến rượu thành dấm đã được nhân dân ta sử dụng từ rất xa xưa. Dấm là một loại thực phẩm chứa 3-5% acid acetic. Để một cốc rượu (3-5% cồn) ngoài trời vài ngày sẽ thấy một lớp váng mỏng *Acetobacter xylinum*. Từ năm 1862, Pasteur đã gọi vi khuẩn này là *Mycoderma aceti*. Sự oxy hóa rượu thành dấm là một quá trình từ từ bằng cách khử dần rượu:

$$CH_3CH_2OH \xrightarrow[2H + 1/2O_2 \rightarrow H_2O]{-2H} CH_3CHO \qquad \text{Acetaldehyd}$$

$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3CH(OH)_2 \qquad \text{Hydrat của acetaldehyd}$$

$$CH_3CH(OH)_2 \xrightarrow[2H + 1/2O_2 \rightarrow H_2O]{-2H} CH_3COOH \qquad \text{Acid acetic}$$

$$CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O + Q$$

Như vậy acetaldehyd và hydrat của acetaldehyd chỉ là những sản phẩm trung gian của quá trình này.

Những vi khuẩn acetic có rất nhiều điểm tương tự Pseudomonas. Chúng khác Pseudomonas ở chỗ chịu được độ acid cao hơn, phân giải pepton yếu, ít di động hơn và không có sắc tố.

Vi khuẩn acetic có thể được chia thành các nhóm:

- Nhóm peroxydans gồm *Acetobacter paradoxum, A. peroxydans.*
- Nhóm oxydans gồm *A. ascendens, A. rancens, A. lavanniense.*
- Nhóm mesoxydans gồm *A. mesoxydans, A. xylinum, A. aceti.*
- Nhóm suboxidans gồm *A. oxidans, A. melanogenum.*

Những loài Acetobacter thường được sử dụng trong công nghiệp là *A. aceti, A. pasteuriasum, A. orleanense, A. xylinum, A. schiitzenbachii và A. suboxydans.*

A. aceti có hình que (0,6μm - 0,8μm x 1-3μm) thường sắp xếp thành cặp đôi hay chuỗi. Bắt màu vàng với thuốc nhuộm iod. *A. xylinum* có dạng que dài 2μm, đứng riêng rẽ hoặc xếp thành chuỗi. Bắt màu xanh với iod và acid sulfuric (phản ứng của hemicellulose). Có thể tích lũy khoảng 4-5% acid acetic trong quá trình lên men. Thường sống chung với nấm men trong một loại nước giải khát dân gian làm bằng nước chè đường gọi là "thủy hoài sâm".

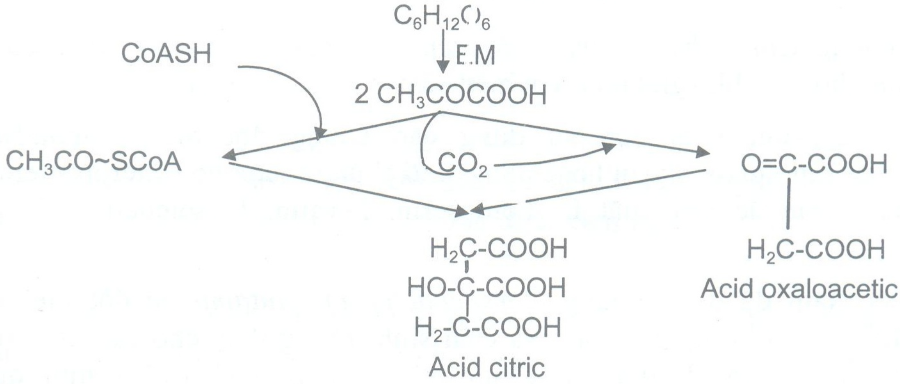
Nói chung vi khuẩn acetic thường phát triển tốt ở nhiệt độ 20-35°C. Một số loài có khả năng tổng hợp vitamin B_1, B_2. Một số loài vi khuẩn acetic như *A. suboxydans, A. xylinum* có khả năng oxy hóa rượu sorbid thành đường sorbose. Chúng được sử dụng trong ngành công nghệ sản xuất vitamin C (acid ascorbic).

5.2. Nấm mốc và sự hình thành acid citric

Nấm mốc là nhóm vi sinh vật hiếu khí, không có khả năng lên men kỵ khí nhưng trong nhiều trường hợp chúng có thể tích lũy trong môi trường nhiều sản phẩm chưa được oxy hóa triệt để, phổ biến nhất là acid hữu cơ như acid citric.

Từ năm 1893, C. Wehmer đã cho biết *Aspergillus niger* trên môi trường chứa đường và có mặt calci carbonat sẽ tích lũy nhiều acid oxalic. Năm 1916, người ta phát hiện thấy nhiều chủng *Aspergillus niger* có khả năng tích lũy khá nhiều acid citric. Đến năm 1926 người ta đã nghĩ ra phương pháp sử dụng môi trường acid để chọn lọc nuôi *Aspergilus niger* và chọn được nhiều chủng có thể chuyển hóa được đến 65% đường thành acid citric.

Cơ chế của sự chuyển hóa này có thể biểu diễn như sau:



Như trình bày ở sơ đồ trên, acid pyruvic tạo thành acetyl coenzym A và chất này sẽ ngưng tụ với acid oxaloacetic để tạo ra acid citric. Để tích lũy acid citric cần kìm hãm các phản ứng kế tiếp. Enzym phosphofructokinase được xác định là enzym điều hòa quá trình tổng hợp acid citric. Ở *A. niger*, enzym này bị ức chế bởi ATP và isocitrat nhưng lại được kích hoạt bởi AMP, phospho vô cơ và NH_4^+. Việc tách acid citric khỏi chu trình Krebs khép kín nhờ những phản ứng bổ sung.

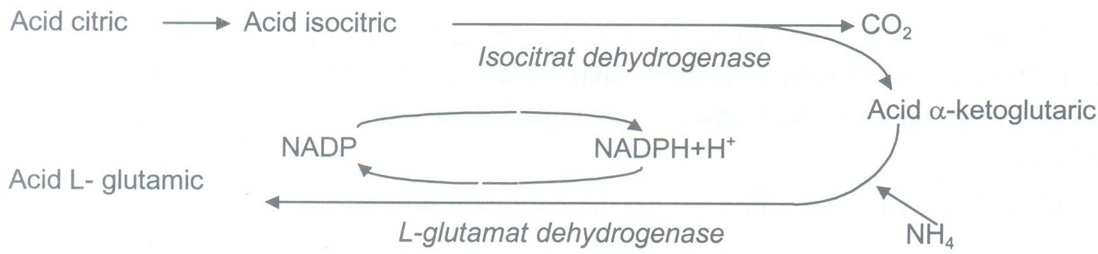
Ngày nay, người ta dùng kỹ thuật dung hợp tế bào trần được sử dụng rộng rãi để tạo tái tổ hợp giữa *A. niger* với nhau để sản xuất acid citric.

5.3. Tạo acid L - glutamic nhờ vi khuẩn

Từ năm 1957, Kinosita đã khám phá ra *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*) có khả năng sinh tổng hợp được acid glutamic và đã được công ty Kyowa Hakko đưa vào sản xuất. Acid glutamic đã tạo được trong điều kiện thông khí. Sau này người ta biết nhiều loài thuộc chi Bacillus và Corynebacterium có khả năng tiết ra môi trường những loại acid L -glutamic.

Khi nuôi cấy trong bình lên men có dung tích 50.000 lít với môi trường chứa 10% đường glucose và dùng urê làm nguồn nitơ, sau 40 giờ nuôi cấy ở 30°C có thể tích lũy hơn 50g acid L -glutamic trong một lít, nghĩa là khoảng 0,6 mol acid glutamic khi sử dụng 1 mol glucose (hiệu suất 60%).

Vi khuẩn phân giải glucose theo con đường EM, sau đó thông qua acid citric và acid α-ketoglutaric tạo thành acid L -glutamic.



Các chủng *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium divaricatum* cần biotin để tổng hợp acid L -glutamic với hiệu suất ít nhất là 30 g/l.

Ngày nay, người ta còn sử dụng các chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* để sản xuất L -lysin hoặc dùng 1 số chủng thuộc họ Enterobacteriaceae và Pseudomonadaceae để sản xuất L -homoserin, L-valin, L-isoleucin, L-tryptophan, L-tyrosin ... .

Ở Việt Nam đã dùng chủng *Corynebacterium glutamicum* đột biến với môi trường rỉ đường mía là nguồn biotin và chất sinh trưởng thay cho cao ngô trong môi trường sinh tổng hợp acid glutamic. Chủng này có đặc điểm: tế bào hình que ngắn, kích thước 0,5-0,9 x 1-30 µm, không di động, Gram dương, không tạo bào tử, dinh dưỡng hóa năng vô cơ, hiếu khí.

5.4. Sự phân giải các hợp chất hữu cơ chứa nitơ (thối rữa)

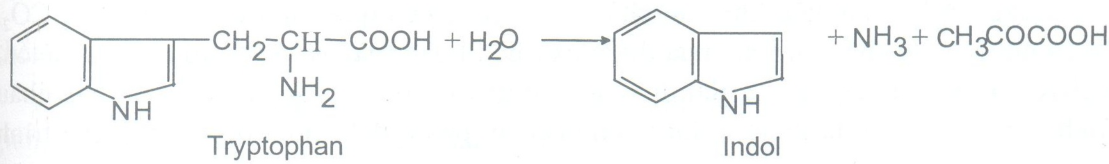
Khác với lên men đường, cơ chất của sự thối rữa là protein. Muốn phân giải protein, đầu tiên vi sinh vật phải tiết ra các enzym phân giải protein ngoại bào và chuyển hóa protein thành những hợp chất có phân tử lượng nhỏ hơn (polypeptid, các oligopeptid). Các chất này hoặc tiếp tục được phân hủy thành acid amin nhờ các enzym peptidase ngoại bào, hoặc được xâm nhập vào tế bào vi sinh vật. Một phần các acid amin này được vi sinh vật sử dụng trong các quá trình tổng hợp protein cho riêng mình, một phần khác tiếp tục phân giải thành NH_3, CO_2 và các sản phẩm trung gian khác. Do tạo ra sản phẩm là NH_3, nên người ta vẫn gọi quá trình phân giải protein là quá trình amon hóa (amonification).

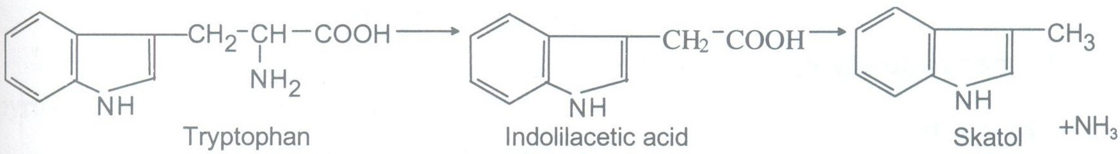
Rất nhiều loài vi sinh vật khác nhau tham gia vào quá trình amon hóa trong tự nhiên. Đáng chú ý nhất là các loài:

Vi khuẩn: *Bacillus mycoides, B. mesentericus, B. subtilis, B. cereus, B. megaterium, B.histoliticus, Proteus vulgaris, Pseudomonas fluorescens, P. aeruginosa, P. putreficans, E. coli, Clostridium sporogenes, Cl. welchii*.

Xạ khuẩn và nấm mốc: *Streptomyces griseus*, *S. rimosus*, *Actinomyces fradiae*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. niger*, *Penicillium camemberti*, *Cephalothecium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Gliocladium roseum* ...

Một số vi khuẩn như *E. coli*, Proteus có khả năng chuyển hóa tryptophan thành hai chất có mùi hôi là indol và skatol. Skatol chính là chất tạo ra mùi thối nhiều nhất ở phân.





Khi quá trình thối rữa xảy ra trong điều kiện thoáng khí thì các quá trình oxy hóa thường được tiến hành đến cùng. Khi đó hầu hết carbon được chuyển thành CO_2. Ngược lại khi quá trình thối rữa xảy ra trong điều kiện kỵ khí thì thường có sự tích lũy các đồng phân trung gian như trên.

Ngoài khả năng phân giải protein, vi sinh vật còn có khả năng phân giải một số hợp chất hữu cơ chứa nitơ khác. Đáng chú ý nhất là khả năng phân giải các base nitơ, urê, acid uric, cyanamid calci và kitin.

Năm 1862, lần đầu tiên Pasteur phát hiện ra vi khuẩn phân giải urê. Càng về sau người ta càng tìm thấy nhiều vi khuẩn tham gia tích cực vào quá trình phân giải này. Đáng chú ý là:

Cầu khuẩn: *Planosarcina ureae, Micrococcus ureae, Sarcina hansenii.*

Trực khuẩn: *Bacillus pasteurii (Urobacillus pasteurii), B.miquelii, B. hesmogenes, B.amylovorum, Pseudobacterium ureolyticum, Chromobacterium prodiogiosum, Proteus vulgaris.*

6. LÊN MEN

Người ta gọi quá trình phân giải carbohydrat trong điều kiện kỵ khí là quá trình lên men. Đây là quá trình oxy hóa khử không hoàn toàn, một phần cơ chất bị khử, còn một phần khác bị oxy hóa. Trong quá trình này carbohydrat được phân giải để thu năng lượng, và hydro tách ra từ cơ chất được chuyển tới chất nhận là một chất hữu cơ. Oxy phân tử không tham gia vào quá trình lên men. Vì vậy Pasteur nói "lên men - đó là sự sống không có không khí".

Năng lượng sinh ra trong quá trình lên men, một phần sẽ dùng cho các phản ứng khử, còn lại một phần được tích lũy trong các liên kết cao năng.

Trong quá trình lên men NADH $+H^+$ sinh ra trong đường phân (EM) sẽ không được chuyển đến oxy phân tử thông qua chuỗi hô hấp. NAD được tái tạo sau khi acid pyruvic hay các sản phẩm của nó nhận H^+.

Trong các tế bào vi sinh vật kỵ khí bắt buộc người ta không thấy các loại enzym hô hấp cyt. b, c, a, cytoxydase, peroxydase, catalase.

Khác với hô hấp hiếu khí, sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men ngoài CO_2, còn có những hợp chất carbon chưa được oxy hóa hoàn toàn (rượu, acid hữu cơ, ceton, aldehyd). Việc chuyển hóa từ giai đoạn acid pyruvic trở đi ở các vi sinh vật khác nhau thì khác nhau. Người ta thường dùng tên của sản phẩm điển hình để gọi tên quá trình lên men ấy.

6.1. Lên men rượu etylic

Tác nhân lên men

Tác nhân chính là các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và những loài khác thuộc chi Saccharomyces như *S.carlsberginensis* và các chi khác như *Schizosaccharomyces pombe* và Kluyeromyces. Chúng là những cơ thể hiếu khí, nhưng trong điều kiện không có oxy phân tử thì chúng lên men glucid để tạo CO_2 và ethanol theo con đường EM.

Phương trình chung theo Gay - Lussac (1810):

$$\underset{180g}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{92g}{2\ CH_3CH_2OH} + \underset{88g}{2\ CO_2} + 28\ Kcal$$

Việc phân giải đường thông qua fructose-1,6-diphosphat cũng thấy ở vi khuẩn *Sarcina ventriculi* theo con đường EM.

Ngược lại ở vi khuẩn *Zymomonas mobilis*, sự phân giải glucose lại theo con đường ED. Sản phẩm chính ở đây là ethanol và CO_2, ngoài ra còn có acid lactic. Nhiều nước sử dụng vi khuẩn *Zymomonas mobilis* để sản xuất etanol đạt tới 178 g/l. Ở một số nấm mốc như là *Mucor* thì glucose được phân giải chủ yếu bằng con đường EM (70% cơ chất) và HMP (30% cơ chất).

Ngoài ra ở vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và Clostridium thì ethanol là sản phẩm phụ, acetaldehyd được hình thành trong trường hợp này không phải từ acid pyruvic dưới tác dụng của pyruvatdecarboxylase mà từ việc khử acetylphosphat.

Phần lớn vi khuẩn sử dụng được đường glucose. Và một số vi khuẩn sử dụng được đường đôi như lactose, mannose, saccharose nhờ có enzym phân giải chúng thành đường đơn glucose.

Cơ chế chung của sự lên men rượu (EM)

Neiberg đã phát hiện thấy nấm men có khả năng lên men chẳng những glucose mà còn ngay cả với acid pyruvic. Điều này được chứng minh bằng phản ứng acetaldehyd với bisulfit (một sản phẩm vô hại với nấm men). Nếu thêm bisulfit vào dung dịch đang lên men thì acetaldehyd sẽ được tách ra dưới dạng acetalsulfonatri:

$$CH_3-C{\overset{O}{\underset{H}{\lessgtr}}} + NaHSO_3 \longrightarrow CH_3CH(OH)SO_3Na\downarrow$$

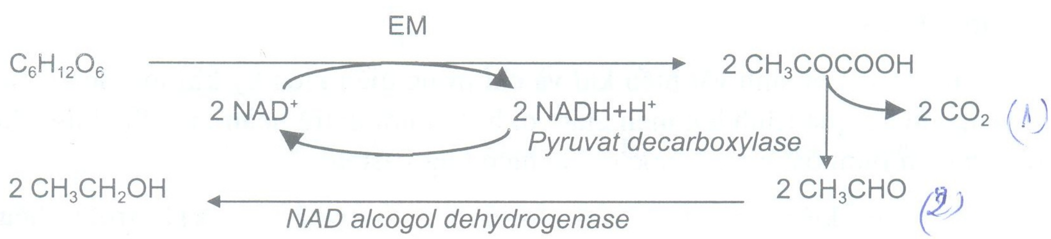
Khi đó nồng độ rượu và CO_2 sinh ra giảm hẳn xuống và một sản phẩm lên men khác là glycerin được hình thành.

Bằng cách đó, ông đã chứng minh rằng chính acetaldehyd là sản phẩm trung gian, và là chất nhận hydro để trở thành ethanol.

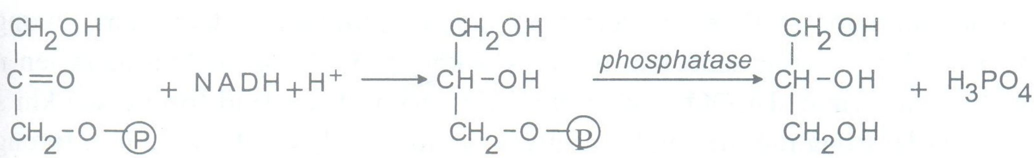
Quá trình lên men rượu gồm hai giai đoạn:

(1) Tác dụng của enzym pyruvat decarboxylase có sự tham gia của TPP, acid pyruvic loại bỏ CO_2 để tạo acetaldehyd.

(2) Acetaldehyd bị khử bởi NADH-alcogol-dehydrogenase (dạng khử) để tạo thành ethanol:



Khi CH_3CHO không thể đóng vai trò nhận H của NADH $+H^+$ với sự có mặt bisulfit thì dihydroxyaceton phosphat sẽ đóng vai trò chất nhận H, tạo ra glycerin phosphat để từ đó tạo glycerin. Qui trình này được áp dụng trong công nghệ sản xuất glycerin:



Dihydroxy aceton P Glycerin P Glycerin

Phương trình chung:

$$2\ C_6H_{12}O_6 + H_2O \longrightarrow CH_2OHCHOHCH_2OH + C_2H_5OH + CH_3COOH + 2\ CO_2$$

Nhiều vi khuẩn lên men lactic, Enterobacter và Clostridium cũng tạo được nhiều ethanol, nhưng chúng không có pyruvatdecaroxylase để tổng hợp acetaldehyd (CH_3CHO). Tuy vậy, chúng lại có acetylCoA đóng vai trò tiền thân của acetaldehyd, chất này bị khử nhờ acetaldehydrogenase:

$$CH_3{-}CO{-}CoA + NADH{+}H^+ \longrightarrow CH_3{-}C\begin{smallmatrix}{=}O\\ \diagdown H\end{smallmatrix} + CoA + NAD$$

Trong môi trường acid (pH 4-4,5), quá trình lên men rượu chia làm hai thời kỳ:

(1) – Thời kỳ cảm ứng: Khi acetaldehyd tạo ra còn ít, chưa đủ nhận H, do đó được chuyển đến aldehyd glycerinic để tạo glycerin.

2 – Thời kỳ sinh rượu: Acetaldehyd sinh ra đã nhiều, đủ nhận H và nồng độ rượu tăng nhanh. Vì vậy glycerin chỉ là sản phẩm phụ trong quá trình lên men rượu. Ngược lại, trong môi trường kiềm thì glycerin và acid acetic là chủ yếu.

Để sản xuất rượu bia và rượu vang, người ta thường dùng lên men "chìm" với *Saccharomyces carlsberginensis* ở 5-10°C hoặc lên men "nổi" *Saccharomyces cerevisiae*. Để sản xuất cồn, người ta dùng nấm men nổi, tạo nhiều CO_2 (1 kg đường tạo 255 lít CO_2 ở 20-28°C).

Chú ý khi làm bia rượu, cần tránh *Saccharomyces intermedius* do làm đục rượu, bia, gây mùi khó chịu; tránh vi khuẩn acetic biến rượu thành CO_2 và H_2O.

Hiệu ứng Pasteur

Nấm men là vi sinh vật hiếu khí và chỉ trong điều kiện kỵ khí mới lên men. Nếu có không khí thì quá trình lên men giảm đi hoặc bị đình trệ hoàn toàn. Sự kìm hãm quá trình lên men rượu bằng oxy được gọi là hiệu ứng Pasteur.

Trong điều kiện kỵ khí, từ một mol đường cho ra 2 mol ATP; trong điều kiện hiếu khí thì cho ra 38 mol ATP. Do tế bào tự điều chỉnh quá trình sử dụng cơ chất nhằm thích nghi với hoàn cảnh sao để thu được năng lượng nhiều nhất.

6.2. Lên men formic (lên men acid hỗn hợp)

Tác nhân

Vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae, là những trực khuẩn Gram âm, thường có chu mao, di động, không sinh bào tử, kỵ khí không bắt buộc có khả năng lên men đường tạo acid formic (HCOOH) và một số sản phẩm khác. Acid formic sau khi sinh ra sẽ tích lũy lại trong môi trường hay chuyển hóa thành H_2 và CO_2 (nếu môi trường có phản ứng acid) dưới tác dụng của enzym formiat hydrogenliase:

$$HCOOH \xrightarrow{\textit{Formiat hydrogenliase}} H_2 + CO_2$$

Người ta thường phân biệt các giống lên men formic của họ Enterobacteriaceae chủ yếu dựa trên đặc điểm lên men đường glucose, lactose và dựa trên một số phản ứng sinh hóa khác như khả năng phân giải protein, khả năng đồng hóa citrat, phản ứng Voges -Proskauer (VP) tức là phản ứng kiểm tra khả năng sinh acetoin.

Một số vi khuẩn như *Salmonella paratyphi* C, Aerobacter sử dụng được citrat như nguồn carbon duy nhất. Trên môi trường chứa citrat như nguồn carbon duy nhất, chỉ có vi khuẩn nào sử dụng được citrat mới phát triển được. Khi đó Na^+ còn lại trong môi trường làm cho pH môi trường chuyển sang kiềm (pH 8) nên làm cho chỉ thị bromothymol từ xanh lá cây chuyển sang màu xanh dương đậm.

Có thể dùng phản ứng đỏ methyl (MR) để xác định vi khuẩn có lên men acid hỗn hợp không. pH chuyển từ 5,5 sang 4,5 sẽ làm cho chỉ thị đỏ methyl chuyển từ màu vàng sang đỏ (dương tính).

Người ta còn gọi lên men acid formic là lên men acid hỗn hợp vì quá trình này sản xuất nhiều loại acid khác nhau: acid formic, acid acetic, acid succinic, acid lactic, ethanol, glycerin, acetoin (acetylmetylcarbinol), 2, 3-butandiol, CO_2 và H_2. Tùy từng loại vi khuẩn đường ruột mà các sản phẩm lên men có thể khác nhau rất nhiều. Tùy thuộc vào sản phẩm lên men trong điều kiện kỵ khí không bắt buộc mà người ta chia thành hai loại:

- Lên men cho ra acid hỗn hợp
- Lên men cho ra acetoin

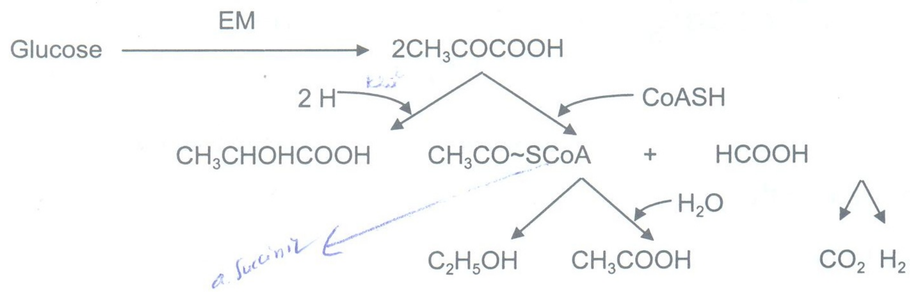
Cơ chế lên men cho ra acid hỗn hợp đặc trưng bởi E.coli, Shigella, Salmonella

Acid pyruvic sinh ra trong quá trình đường phân EM được khử thành acid lactic nhờ enzym lactat dehydrogenase và một phần chuyển thành acetylphosphat (hay acetylCoA) và acid formic.

$$CH_3COCOOH + H_3PO_4 \rightarrow CH_3COOPO_3^{2-} + HCOOH$$

Các cofactor của phản ứng này là TPP (Thiamin pyrophosphat) và CoA.

CO_2 và H_2 được sinh ra trong quá trình phân giải HCOOH. Acetylphosphat một phần tiếp tục được phân giải thành ethanol, còn một phần được phân giải thành acid acetic. Acid succinic cũng được sinh ra do sự oxy hóa acetylCoA theo chu trình Krebs.

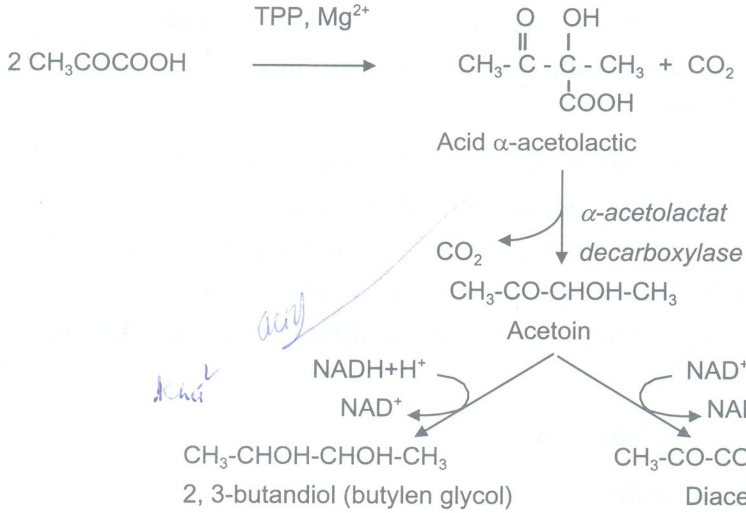


Hình 4.10. Sơ đồ lên men acid hỗn hợp

Do vậy khi nuôi *E. coli* trong môi trường glucose sẽ tạo ra nồng độ H^+ cao, nên pH xuống dưới 4,5 làm cho đỏ metyl có màu đỏ.

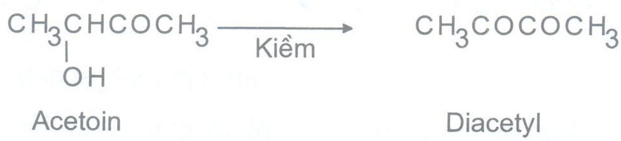
Lên men cho ra acetoin đặc trưng bởi Aerobacter, Serratia và một số loài Bacillus

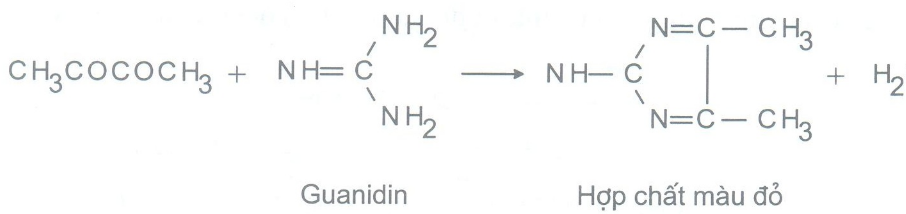
Ở đây một phần acid pyruvic cũng được phân giải theo cơ chế như ở *E. coli*, song phần lớn acid pyruvic lại tập trung để tạo acetylmetylcarbinol (acetoin) và sau khi được khử thì trở thành 2,3-butandiol hoặc được oxy hóa để trở thành diacetyl (hình 4.11).



Hình 4.11. Sơ đồ lên men butandiol

Để kiểm tra khả năng tạo acetoin, người ta thường dùng phản ứng Voges - Proskauer (VP). Nguyên tắc của phản ứng này là trong môi trường kiềm, acetoin sẽ bị oxy hóa thành diacetyl. Chất này sẽ kết hợp với nhóm guanidin trong arginin của pepton để tạo thành một hợp chất màu đỏ (phản ứng dương tính).





6.3. Lên men lactic

Tác nhân

Vi sinh vật lên men lactic được Pasteur (1857) tìm ra từ sữa chua (lactic có nghĩa là sữa). Phần lớn vi khuẩn lên men lactic thuộc về họ Lactobacteriaceae, hình cầu, hình que ngắn, Gram dương, không di động, không có cytochrom và catalase, nhưng sống được trong điều kiện có oxy không khí vì có peroxydase phân giải H_2O_2 thành H_2O và oxy. Vì vậy người ta gọi chúng là vi khuẩn vi hiếu khí (microaerophile) hoặc kỵ khí không bắt buộc (Rose, 1968; Schlegel, 1972). Sự phân bố của vi khuẩn lactic trong tự nhiên càng chứng tỏ những vi khuẩn này có nhu cầu dinh dưỡng cao và khả năng phân giải để thu năng lượng của chúng. Những vi khuẩn lactic ít gặp trong đất, nước mà thường thấy ở: (1) Trong sữa và các sản phẩm của sữa: *Lactobacillius lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *S. diacetilactis*. (2) Trên bề mặt của thực vật và xác cây đang bị phân giải thường gặp *Lactobacillus plantarum*, *L. delbruckii*, *L. fermenti*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*. (3) Trong ruột và ở lớp màng nhầy của người và động vật có: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Str. salivarius*, *Str. bovis*, *S. pyogenses*, *Pediococcus*.

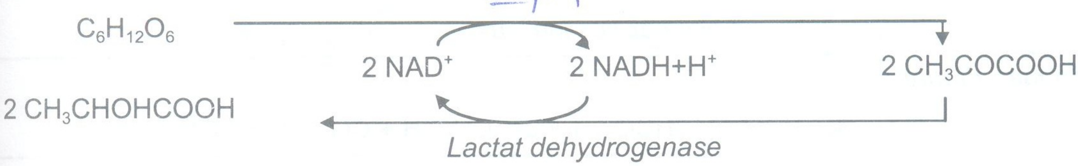
Dựa vào sản phẩm sinh ra trong quá trình lên men glucose, người ta chia vi khuẩn lactic thành hai nhóm: nhóm lên men lactic đồng hình (homofermentative) và nhóm lên men dị hình (heterofermentative).

Cơ chế

Lên men lactic đồng hình LCH

Những loài *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus* có khả năng tích lũy đến 90% acid lactic trong các sản phẩm lên men. Chúng phân giải glucose theo con đường EM. Vi khuẩn sử dụng tất cả các loại enzym, kể cả aldolase, hydro được tách ra nhờ khử hydro của triophosphat được chuyển đến acid pyruvic theo sơ đồ dưới đây:

EM

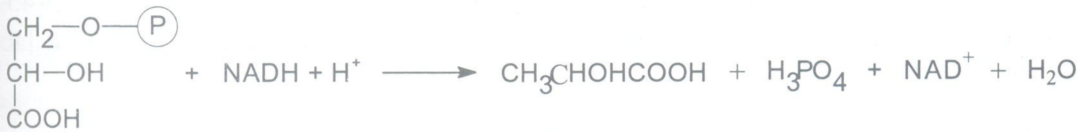


Theo V. N. Saponhicov (1968) lên men đồng hình gồm hai giai đoạn:

- *Giai đoạn 1:* Thời kỳ sinh trưởng lũy thừa của vi khuẩn, từ hexose tạo ra acid phosphoglycerinic nhờ sự oxy hóa phosphoglyceraldehyd kèm theo việc khử NAD:

3 (P) glyceraldehyd

- *Giai đoạn 2:* Do $NADH+H^+$ tăng, nên thế oxy hóa khử của môi trường giảm xuống, dẫn tới sự nhường hydro từ $NADH+H^+$ cho acid phosphoglycerinic để khử thành acid lactic:



Chỉ có một phần acid pyruvic tiếp tục khử carboxyl thành acid acetic, ethanol, CO_2 và aceton. Số lượng sản phẩm tùy thuộc vào lượng oxy trong môi trường.

Vi khuẩn lên men lactic sử dụng cả những loại đường đơn khác như glucose, galactose, levulose và đường kép như lactose, saccharose và maltose.

Bảng 4.2. *Những vi khuẩn lactic quan trọng nhất*

Cầu khuẩn	Trực khuẩn
Lên men đồng hình:	
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CHOHCOOH$	
	Vi khuẩn ưa nhiệt (T^o_{opt} = 40°C, không mọc ở 15°C)
Streptococcus lactis	*Lactobacillus lactis*
Streptococcus faecalis	*Lactobacillus helveticus*
Streptococcus salivarius	*Lactobacillus acidophilus*
Streptococcus pyogenes	*Lactobacillus bulgaricus*
Streptococcus cremoris	*Lactobacillus delbruckii*
Streptococcus thermophilus	Vi khuẩn ưa ẩm ((T^o_{opt}=30-37°C, mọc ở 15°C)
Streptococcus diacetilactis	*Lactobacillus casei*
Pediococcus cerevisiae	*Lactobacillus plantarum*
	Lactobacillus inulinus
Lên men dị hình:	
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2 + CH_3COOH$	
Leuconostoc mesenteroides	*Lactobacillus brevis*
(Betacoccus)	*Lactobacillus viridescens*
Leuconostoc cremoris	*Lactobacillus fermenti*
	Bifidobacterium bifidum

Những vi khuẩn sau đây đóng vai trò quan trọng trong công nghệ và đời sống:

Streptococcus lactis: Trong môi trường tích lũy đến 1% acid lactic, nhiệt độ tối thiểu 10°C, tối đa 40-45°C, một số chủng tạo kháng sinh nisin.

S. cremosis: Mọc tốt ở 25°C, nhiệt độ tối thiểu 10°C, tối đa 36-38°C. Một số chủng tạo kháng sinh diploccocin.

S. thermophillus: Mọc tốt ở 40-45°C, tích lũy khoảng 1% acid lactic.

Lactobacillus bulgaricus: Không lên men saccharose. Nhiệt độ tối ưu 40-45°C, tối thiểu 15-20°C. Đây là loài tạo acid nhiều, có thể tích lũy đến 2,5-3,5% acid lactic trong sữa.

L. casei: Tích lũy đến 1,5% acid lactic. Nhiệt độ tối ưu 30-35°C

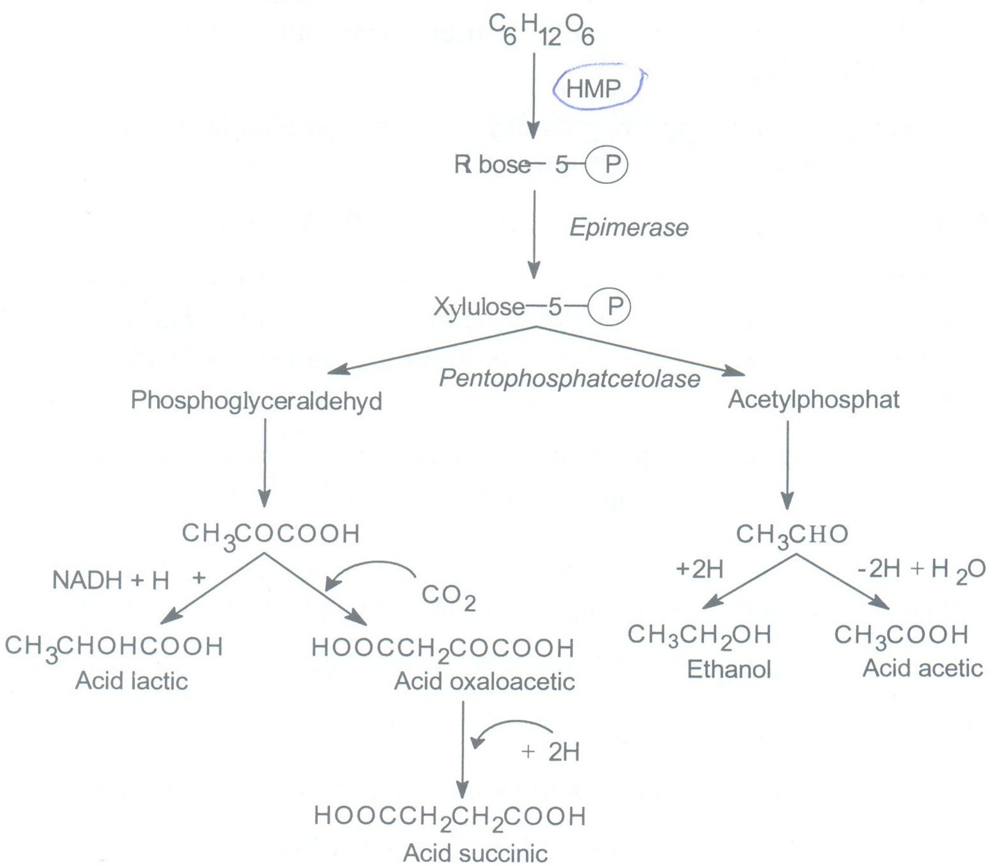
L. acidophillus: nhiệt độ tối ưu 37-40°C, tối thiểu 20°C, tích lũy đến 2,2% acid lactic.

L. delbrueckii: không lên men lactose, vì thế mà không mọc trong sữa. Nhiệt độ tối ưu 37-40°C, tối thiểu 20°C. Trong sữa tích lũy đến 2,5% acid lactic.

L. plantarum: nhiệt độ tối ưu 30°C, tích lũy được 1,3% acid lactic.

Sự lên men lactic dị hình

Lactobacillus brevis, *L. fermenti*, *Bifidobacterium bifidum* không có các enzym thực hiện phân giải đường glucose theo EM (không có aldolase, triophosphatisomerase) mà chủ yếu theo con đường HMP theo sơ đồ ở hình 4.12.



Hình 4.12. Sơ đồ lên men lactic dị hình

Ứng dụng

Người ta đã biết hiện tượng lên men lactic từ lâu để làm sữa chua, muối dưa, ủ thức ăn gia súc, sản xuất acid lactic (làm mềm và nở da), dùng trong công nghiệp dệt (nhuộm, in), tổng hợp chất dẻo, công nghiệp thực phẩm. Sản xuất lactat canxi, dùng để bổ sung calci dưới dạng dễ hấp thụ cho cơ thể, lactat sắt dùng để chữa bệnh thiếu máu, lactat đồng dùng làm dung môi và các vi khuẩn lên men lactic được dùng làm probiotic.

6.4. Lên men propionic

Tác nhân

Phần lớn vi khuẩn lên men propionic thuộc chi Propionibacterium thuộc họ Lactobacteriaceae. Đó là loại vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc. Phần lớn vi khuẩn này có cytochrom và catalase.

Vi khuẩn propionic là những vi khuẩn Gram dương, không di động, không có bào tử. Khi nuôi cấy trong môi trường trung tính, ở điều kiện kỵ khí chúng có hình cầu, xếp thành đôi hay chuỗi. Khi nuôi cấy thoáng khí, chúng có hình que hay phân nhánh. Vi khuẩn propionic thuộc loại phát triển chậm, thường sau 5-7 ngày nuôi cấy mới xuất hiện khuẩn lạc.

Vi khuẩn propionic sống trong dạ dày của động vật nhai lại và tham gia vào quá trình tạo ra các acid béo.

Một số loài được sử dụng là: *P. freudrenreichii, P. shermanii, P. acidopropionice.*

Vi khuẩn propionic có nhiều điểm giống với vi khuẩn lactic và thường phát triển cùng nhau. Chúng đòi hỏi nhiều chất dinh dưỡng (nitơ, vitamin). Đa số phát triển trên môi trường pH dưới 5-4, 5. Nhiệt độ tối ưu 30-35°C , không mọc ở 15-25°C, bị chết ở nhiệt độ 60-70°C.

Những vi khuẩn lên men propionic có khả năng sử dụng các loại đường glucose, saccharose, lactose, pentose và hợp chất như acid lactic hoặc acid malic, glycerin.

Cơ chế

Sản phẩm của quá trình lên men propionic là acid propionic, acid acetic, CO_2 và H_2O:

$$3\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 4\ CH_3CH_2COOH + 2\ CH_3COOH + 2\ H_2O + 2\ CO_2 + Q$$

Vi khuẩn propionic phân giải đường hexose theo con đường EM.

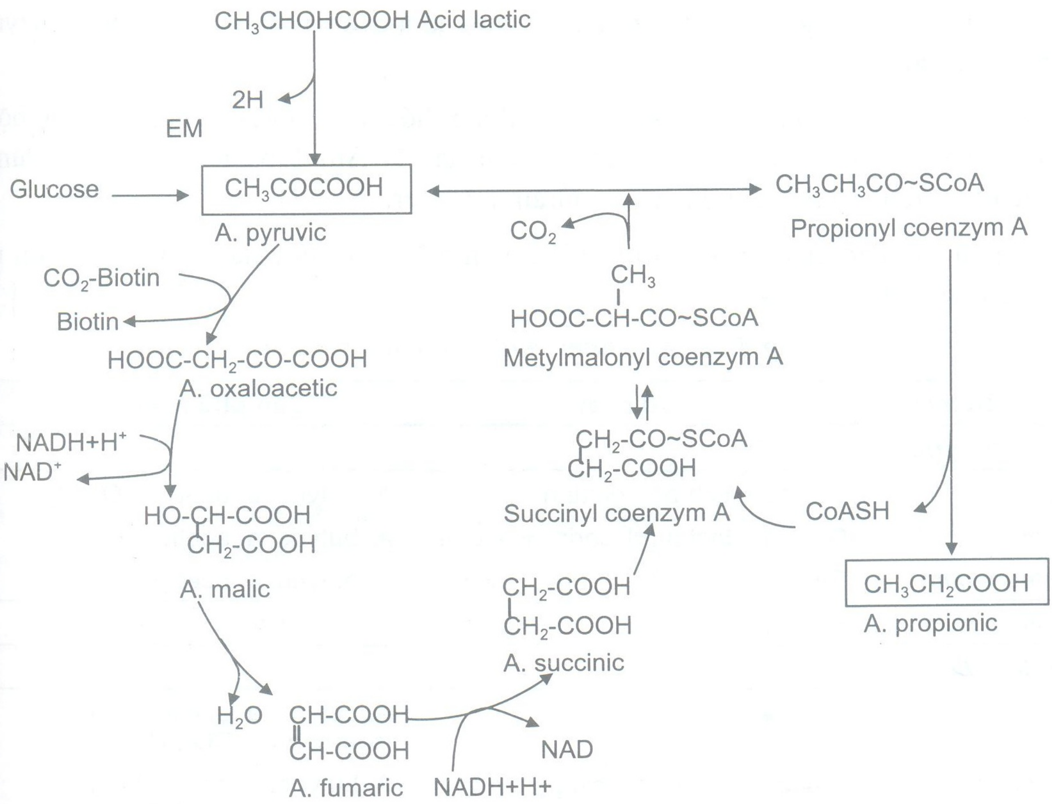
Sự tạo thành acid propionic từ acid lactic diễn ra theo phương trình tổng quát:

$$3\ CH_3CHOHCOOH \longrightarrow 2\ CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

Nghiên cứu tỷ lệ các sản phẩm lên men, người ta thấy ứng với một phân tử acid pyruvic được oxy hóa đến acid acetic và H_2O thì có hai phân tử acid pyruvic biến thành acid propionic.

Ứng dụng

Vi khuẩn propionic tham gia tích cực vào quá trình sản xuất phomat. Giai đoạn lên men propionic là giai đoạn kế tiếp với giai đoạn lên men lactic. Các acid sinh ra khi lên men propionic (acid acetic, acid propionic) đã tạo ra vị cay của phomat, còn CO_2 sinh ra sẽ tạo độ xốp của phomat.



Hình 4.13. Cơ chế quá trình chuyển hóa từ acid pyruvic đến acid propionic

Một số loài vi khuẩn Propionibacterium (như *P. shermanii*, *P. freudrenreichii*, *P. zeae*) đang được chú ý vì có khả năng sản sinh ra nhiều vitamin B_{12}. Nhiều nơi trên thế giới đã dùng các vi khuẩn này để sản xuất vitamin B_{12}.

6.5. Lên men butyric

Tác nhân

Lên men saccharose tạo acid butyric được Pasteur khám phá năm 1861. Không bao lâu sau, người ta xác định nhóm vi khuẩn kỵ khí bắt buộc đó là đại diện chủ yếu của 4 chi: Clostridium, Butyrivibrio, Eubacterium và Fusobacterium. Trong đó nổi bật hơn cả là chi Clostridium.

Chi Clostridium bao gồm các vi khuẩn Gram dương, di động nhờ chu mao, tế bào dinh dưỡng hình que, bào tử lớn hơn tế bào và nằm ở cực làm cho tế bào khi nang bào tử có hình dạng như dùi trống.

Đa số các loài thuộc chi Clostridium là kỵ khí bắt buộc, chỉ có một số ít loài như *C. pectinovorum*, *C. histolyticum* là kỵ khí không bắt buộc. Ở đa số loài Clostridium người ta thấy hàm lượng enzym flavin đạt tới mức khá cao và không thấy chứa enzym cytochrom, catalase.

Nhiều loài Clostridium có khả năng đồng hóa các polysaccharid (tinh bột, amylose) vì vậy trước đây người ta còn gọi chi này là Amylobacter. Cũng vì chúng chứa các hạt (granule) nên còn mang tên Granulobacter.

Căn cứ vào đặc điểm của quá trình lên men mà người ta chia chi Clostridium ra thành các nhóm như bảng 4.3.

Bảng 4.3. *Các nhóm thuộc chi Clostridium*

Dạng lên men	Cơ chất	Sản phẩm lên men
Lên men butyric		
C. butyricum	Glucose, tinh bột, dextrin	A. butyric, a. acetic, CO_2, H_2
C. lactoacetophilum	Glucose, lactat (glycerin) + acetat	A. butyric, a. acetic, CO_2, H_2
C. pasteurianum	Glucose, tinh bột, mannit, inulin	A. butyric, a. acetic, CO_2, H_2
C. pectinovorum	Pectin, tinh bột, glycogen, dextrin	Acid acetic
Tạo butanol		
C. butylicum	Glucose	A. butyric, a. acetic, butanol, isopropanol, CO_2, H_2
C. acetobutylicum	Glucose, glycerin, acid pyruvic	A. butyric, a. acetic, butanol, aceton, ethanol, CO_2, H_2
Tạo acid propionic		
C. propionicum	Alanin, threonin	A. acetic, a. propionic, CO_2
Tạo acid capronic		
C. kluyveri	ethanol + a. acetic + CO_2	A. capronic, a. butyric, H_2
Phân giải protein		
C. botulinum	Protein, acid amin	A. acetic, a. lactic, NH_3, H_2
C. histolyticum		
C. sporogenes		
C. sticklandii		
Các kiểu trao đổi chất đặc biệt		
C. aceticum	CO_2, H_2, fructose	A. acetic
C. tetanomorphum	A. glutamic, histidin	A. butyric, a. acetic, NH_3, CO_2, H_2
C. acidi-urici		

Cơ chế

Về cơ chế của sự hình thành các sản phẩm lên men như acid butyric, acid acetic, ethanol, butanol, aceton và isopropanol ở một số loài Clostridium có thể trình bày trong hình 4.14.

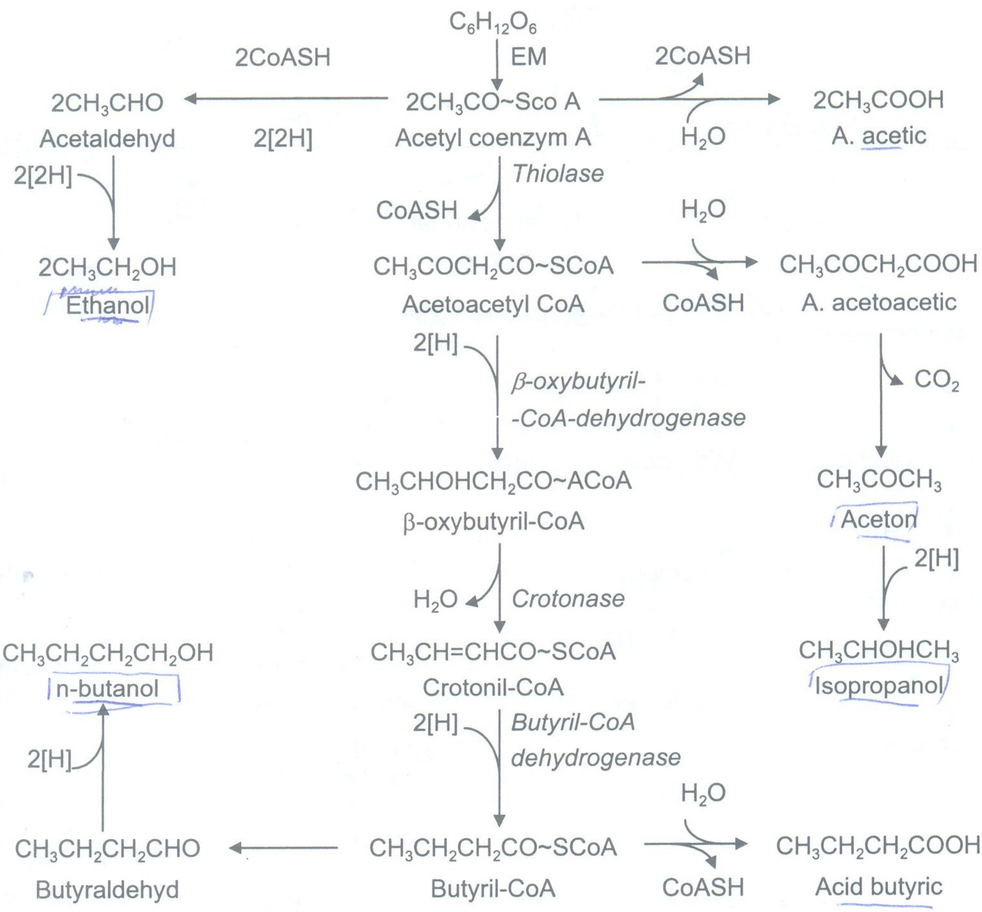
Phương trình chung của quá trình lên men butyric là:

$$\underset{\text{Glucose}}{12\ C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{\text{Butanol}}{CH_3CH_2CH_2CH_2OH} + \underset{\text{Aceton}}{4\ CH_3COCH_3} + \underset{\text{Ethanol}}{CH_3CH_2OH} +$$

$$\underset{\text{A. butyric}}{CH_3CH_2CH_2COOH} + 18\ H_2 + 28\ CO_2 + 2\ H_2O + Q$$

Ứng dụng

Vì butanol, aceton và isopropanol là những dung môi hữu cơ rất cần trong kỹ thuật, nên sự lên men butyric gây ra bởi Clostridium có tầm quan trọng công nghiệp. Mặt khác, do lên men làm hư hỏng nhiều hoa quả vì chúng phá vỡ các chất gian bào (pectin) là cho tế bào rời nhau, tạo điều kiện cho vi khuẩn gây thối xâm nhập nên cần có điều kiện thích hợp để bảo quản rau quả. Người ta thường lợi dụng *Clostridium pectinovorum*, *C. felsineum* trong công nghiệp ngâm đay làm giấy.



Hình 4.14. Sơ đồ quá trình lên men butyric

6.6. Clostridium và sự lên men acetic

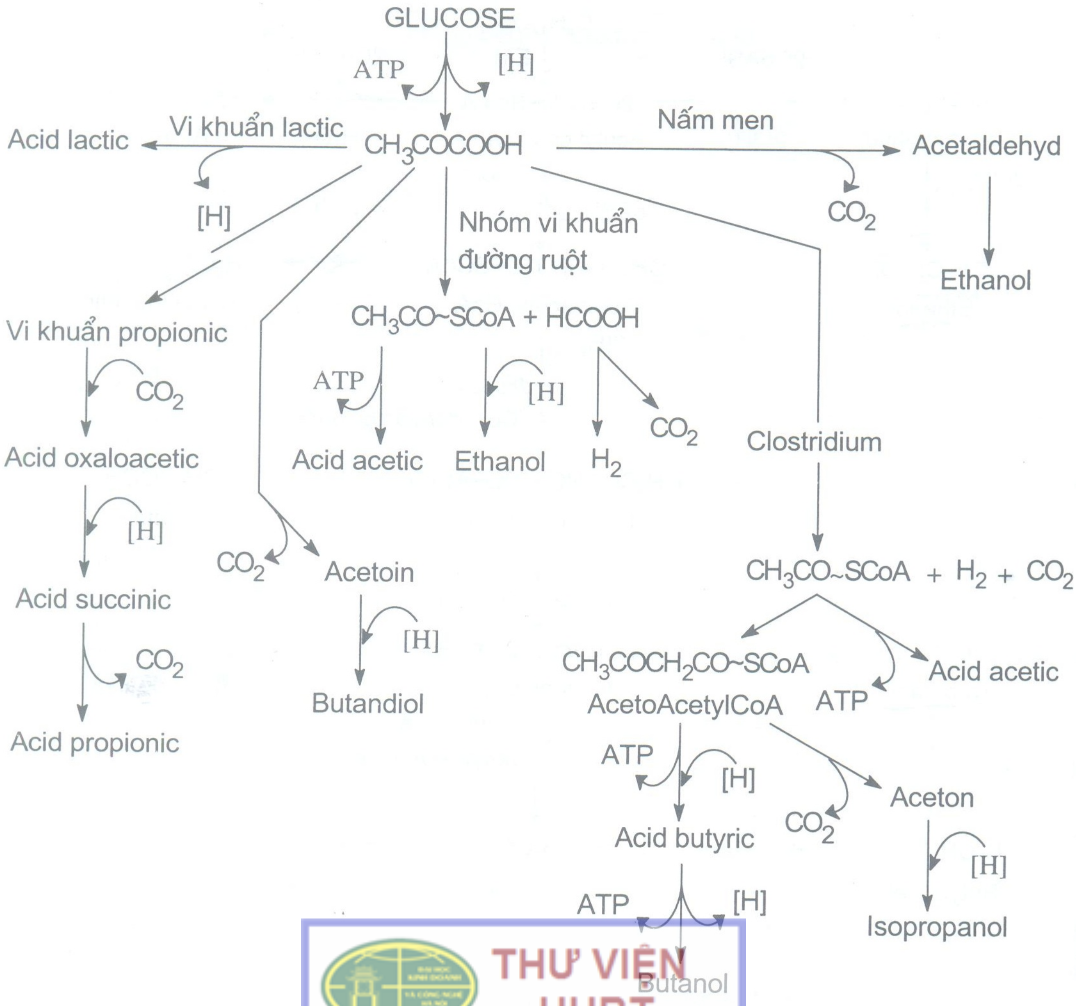
Một số loài Clostridium như *C. aceticum, C. thermoaceticum, C. acidiurici* và *C. cylindrosporum* có khả năng chuyển hydro được tách từ cơ chất, chẳng những đến chất nhận là những chất hữu cơ mà còn có thể đến CO_2, để tạo acid acetic:

$$8\,[H] + 2\,CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\,H_2O$$

Đây là một quá trình lên men kỵ khí, khác với sự oxy hóa không hoàn toàn biến rượu thành dấm.

Những loài ưa nóng *C. thermoaceticum* và loài ưa ẩm *C. aceticum* có khả năng hình thành acid acetic là chủ yếu khi chúng lên men hexose.

6.7. Sơ đồ tổng quát các quá trình lên men chính (hình 4.15)



Hình 4.15. Tổng quát các quá trình lên men chính

Thực chất của các quá trình lên men là hydro được tách ra từ sự khử hydro của cơ chất và sự khử hydro của triophosphat được chuyển đến NADH +H+. (Đồng thời nhờ quá trình phosphoryl hóa cơ chất mà có sự tích lũy năng lượng ATP). Hydro này không thể được đào thải ra ngoài dưới dạng hydro phân tử, mà phần lớn phải chuyển đến chất nhận là một hợp chất hữu cơ nào đó (hoặc đến CO2). Khi khử các chất nhận hydro thì NAD được tái sinh, do đó lại có thể tham gia vào quá trình khử triophosphat. Các sản phẩm được khử bị thải ra môi trường. Có khi hydro được tạo ra do quá trình phân giải acid pyruvic lại được bài tiết ra ngoài dưới dạng khí, thông qua acid formic (như ở E. coli) hoặc feredoxyl (như ở C. pasteurianum).

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Khi màng tế bào vi khuẩn bị tổn thương, sẽ xảy ra hiện tượng:

a. Quá trình tổng hợp ATP dừng lại

b. Proton tiếp tục được vận chuyển qua màng

c. Electron tiếp tục được vận chuyển qua màng

d. Proton tiếp tục được vận chuyển qua hệ thống cytochrom

e. a và d

2. Trong quá trình hoá thẩm thấu, sự chênh lệch điện hoá giữa trong và ngoài màng tế bào được tạo ra bởi sự tích tụ bên ngoài màng:

a. Electron

b. Proton

c. Protein

d. ATP synthetase

e. Ion phosphat

3. Trong điều kiện k khí, *S. cerevisae* chuyển hoá glucose theo con đường:

a. ED

b. HMP

c. EM

d. ATC

e. Hô hấp

4. *E.coli* cho phản ứng MR dương tính là do lên men tạo ra:

a. Ethanol

b. Butandiol

c. Acid lactic

d. Hỗn hợp acid

e. Acid citric

5. Các vi khuẩn lên men lactic dị hình có thể phân giải glucose cho ra:

a. Acid lactic

b. Acid acetic

c. Ethanol

d. Acid succinic

e. Tất cả đúng

6. Hệ thống enzym của quá trình hô hấp nitrat ở vi khuẩn:

a. Chỉ được tạo ra trong điều kiện thiếu oxy

b. Đưa NH_3 tham gia vào quá trình đồng hoá

c. Tạo ra hệ thống cytochrom vận chuyển oxy

d. Chịu sự điều hoà của hệ thống cytochrom

e. Là hệ thống enzym của thành tế bào

7. Chất nào là sản phẩm trung gian chính của quá trình lên men rượu là:

a. Acid acetic

b. Anhydric acetic

c. Acetaldehyd

d. Aceton

e. Glycerin

8. Các vi khuẩn có khả năng lên men butyric thường thuộc chi:

a. Propiobacterium

d. Clostridium

b. Lactobacillus

c. Bacillus

e. Bifidobacterium

9. Đây là phương trình tổng quát của quá trình lên men:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + H_2O + CO_2$$

a. Butyric

b. Propionic

c. Formic

d. Lactic

e. Rượu

10. Các vi khuẩn có khả năng hô hấp sulfat thuộc nhóm vi khuẩn:

a. Hiếu khí

b. Vi hiếu khí

c. Kỵ khí bắt buộc

d. Kỵ khí không bắt buộc

e. c và d

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. ***Vi sinh vật học***. 2001. NXB Giáo Dục.

2. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

3. G. J. Tortora, B. R. Funke, C.L Case. ***Microbiology – An Introduction***. 6th edition, 1992, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bài 5

DI TRUYỀN VI KHUẨN

MỤC TIÊU

1. *Nêu được bản chất của các con đường truyền gen giữa các tế bào vi khuẩn: tiếp hợp, biến nạp, tải nạp.*
2. *Phân biệt được các yếu tố di truyền vận động.*

1. VẬT LIỆU DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN

Các sinh vật nhân nguyên thủy và virus cũng có các quá trình sinh sản tương đương sinh sản hữu tính, được gọi là *cận hữu tính* (parasexuality).

Sự di truyền của vi khuẩn có những đặc điểm: truyền thông tin một chiều từ tế bào cho sang tế bào nhận và tạo hợp tử từng phần. Thể cho chỉ chuyển một đoạn của bộ gen sang thể nhận nên chỉ lưỡng bội ở một phần, các phần khác đơn bội. Bộ gen thường chỉ là một phân tử ADN trần nên chỉ có một nhóm liên kết gen và tái tổ hợp thực chất là lai phân tử .

Người ta thường dùng *E. coli*, một loại vi khuẩn đường ruột làm đối tượng nghiên cứu bộ máy di truyền của tế bào nhân nguyên thủy.

Vật chất di truyền trong tế bào vi khuẩn chỉ bao gồm thể nhiễm sắc, là một phân tử ADN xoắn kép, thắt vòng lại thành một vòng kín. Nhiễm sắc thể vi khuẩn tồn tại tự do trong tế bào chất không có màng nhân bao quanh cũng như không có protein bảo vệ như ở tế bào nhân thật. Nhiễm sắc thể vi khuẩn dài khoảng 1mm, đường kính khoảng 2 nm, chứa 4,2 triệu cặp base nitơ. Phân tử ADN có thể cuộn xoắn để chứa được trong 1 tế bào có chiều dài khoảng 2 μm, tức là khoảng 1/500 chiều dài của nhiễm sắc thể.

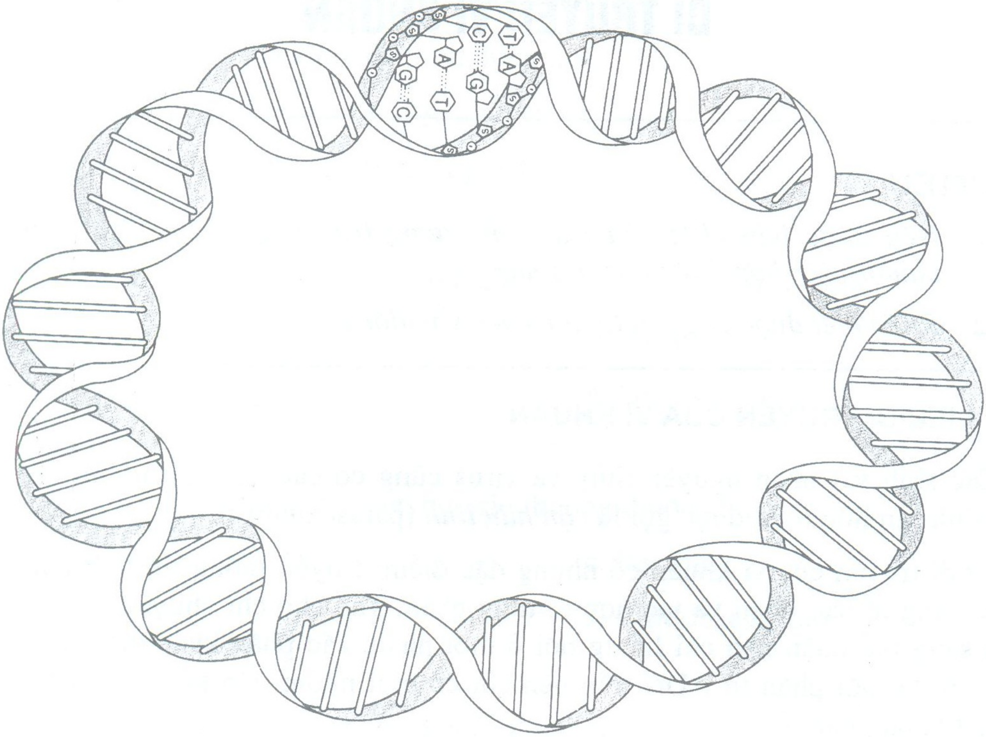
Nhiễm sắc thể của *E. coli* chứa gần 4.000 gen, trong khi một số virus chỉ chứa bốn đến vài trăm gen và nhiễm sắc thể của người chứa tới 30.000-40.000 gen.

Quá trình kết cuộn khá chính xác để các gen nằm dọc phân tử ADN được biểu hiện liên tục để ARN-polymerase nhận diện các cistron cùng lúc trong quá trình sao mã. Và mặc dù nhiễm sắc thể cuộn xoắn hàng ngàn lần, nhưng trong quá trình sao chép hai phân tử con vẫn tách ra không bao giờ rối.

2. SỰ SAO CHÉP CỦA NHIỄM SẮC THỂ VI KHUẨN

E. coli là vi khuẩn được nghiên cứu kỹ nhất. Ba dòng thường gặp trong các phòng thí nghiệm di truyền là *E. Coli* B (tế bào chủ của các phage dãy T), *E. coli* C (tế bào chủ của phage một mạch như ϕX174) và *E. coli* K_{12} (tế bào chủ của phage λ).

Thông tin di truyền của tế bào vi khuẩn nằm trên một phân tử ADN mạch kép, vòng đơn, được gọi là genophore hay "nhiễm sắc thể " (chromosome).



Hình 5.1. Nhiễm sắc thể của vi khuẩn

Tế bào vi khuẩn phân chia theo lối trực phân. Phân tử ADN gắn trực tiếp vào màng nguyên sinh chất. ADN sao chép thành hai bản gắn chung nhau trên màng nguyên sinh chất (hình 5.2). Khi tế bào kéo dài ra, các bản sao ADN tách xa nhau do phần màng giữa chúng lớn dần ra. Kiểu sinh sản vô tính này được gọi là "ngắt đôi". Tế bào vi khuẩn phân chia nhanh hơn rất nhiều so với tế bào nhân thật.

Quá trình sao chép ADN được bắt đầu từ điểm xuất phát *ori*, kéo dài về hai phía song song với quá trình chia đôi màng sinh chất, nơi có điểm gắn vào của ADN và tách 2 phân tử ADN về 2 tế bào con.

ADN của *E. coli* cần 40 phút cho một chu kỳ sao chép tương ứng với tốc độ 50.000 bp /phút, phụ thuộc vào tốc độ tăng trưởng, thời gian phân chia tế bào trong khoảng 18 đến 60 phút. Như vậy, ở các tế bào tăng trưởng nhanh, chu kỳ sao chép mới được bắt đầu sớm hơn sự phân bào của tế bào mẹ.

3. CÁC KIỂU SAO CHÉP ADN Ở *E. COLI*

3.1. Kiểu sao chép theta (θ) còn gọi là kiểu sao chép Cairns

Kính hiển vi điện tử cho thấy phân tử ADN cuộn xoắn có dạng hình tròn và sao chép bắt đầu từ một điểm gọi là điểm xuất phát Ori và đi theo hai chiều quanh vòng tròn.

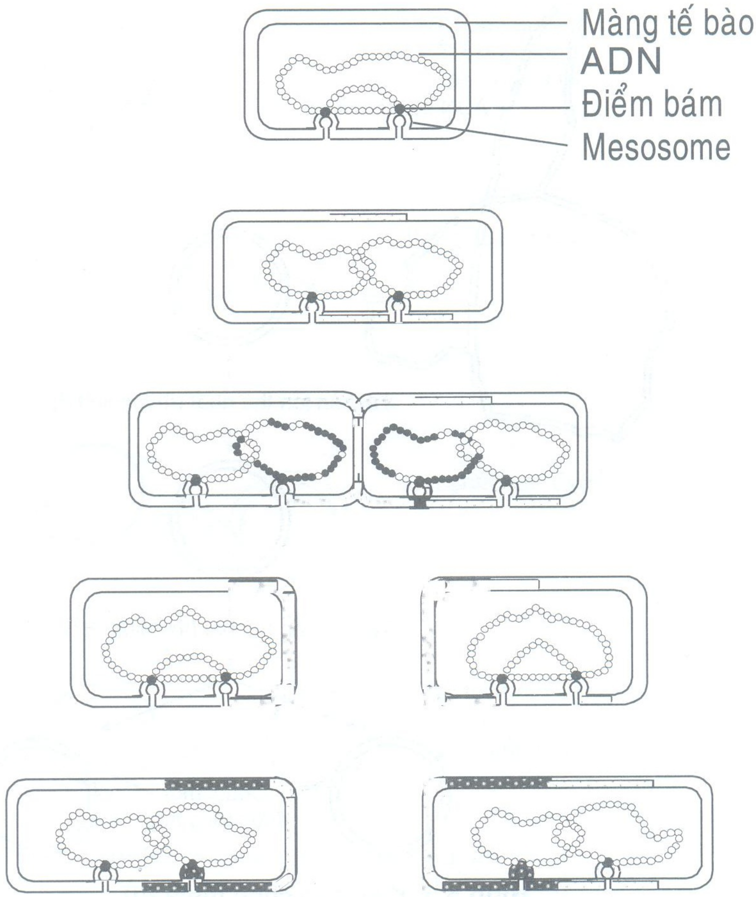
(1)

(2)

(3)

(4)

(5)



Hình 5.2. Sự sinh sản vô tính bằng cách "ngắt đôi"

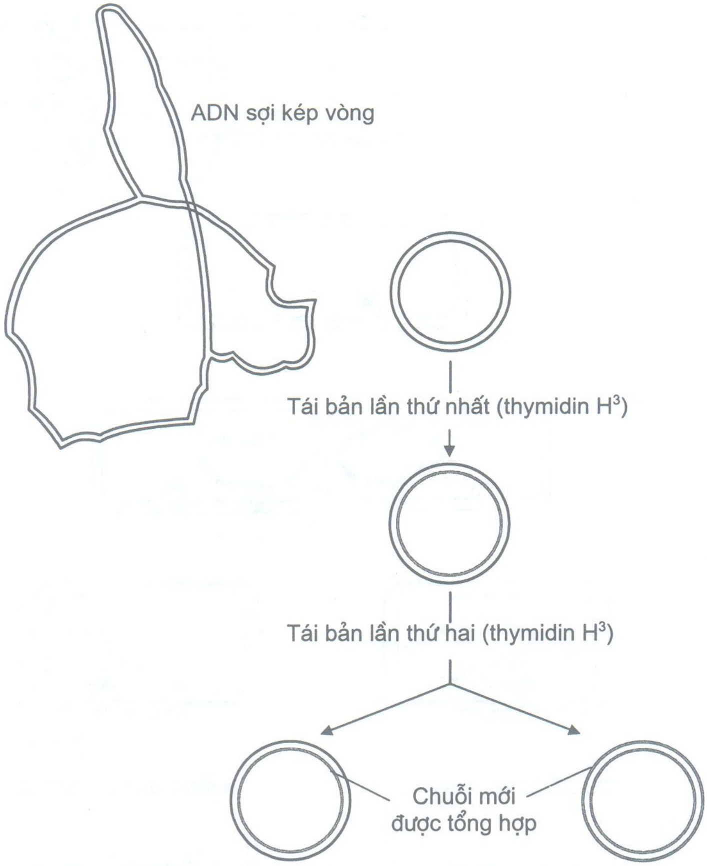
1. Tế bào con có ADN sao chép một phần; 2. Sao chép vừa xong 2 điểm gắn ADN vào màng được tách đôi; 3. Giai đoạn cuối phân bào; 4. Hai tế bào con; 5. Chu trình lặp lại.

Người ta gọi đây là kiểu sao chép theta vì các phân tử sao chép giống chữ cái Hy Lạp theta (θ). Kiểu này do John Cairns tìm ra năm 1962 nên còn gọi là kiểu Cairns. Các phân tử ADN sao chép được gắn vào màng tế bào, bảo đảm cho chúng tách nhau ra trong phân bào.

Kết quả sao chép nhiễm sắc thể của vi khuẩn với sự có mặt của thymidin H^3.

Khi ADN vòng tròn đang sao chép quan sát thấy dạng ADN "con mắt" chẻ ba sao chép lan dần, cuối cùng tạo ra hai phân tử ADN lai: một mạch có mang dấu phóng xạ T-H^3 (thymidin H^3). Có trường hợp sao chép chỉ xảy ra về một phía.

E. coli chỉ có một điểm xuất phát sao chép nên cả ADN thành một đơn vị sao chép thống nhất gọi là replicon. Replicon được hiểu là đơn vị sao chép. Bộ máy di truyền của các sinh vật nhân nguyên thủy thường chỉ có một replicon.



Hình 5.3. Kiểu sao chép theta (θ)

3.2. Kiểu sao chép lăn vòng

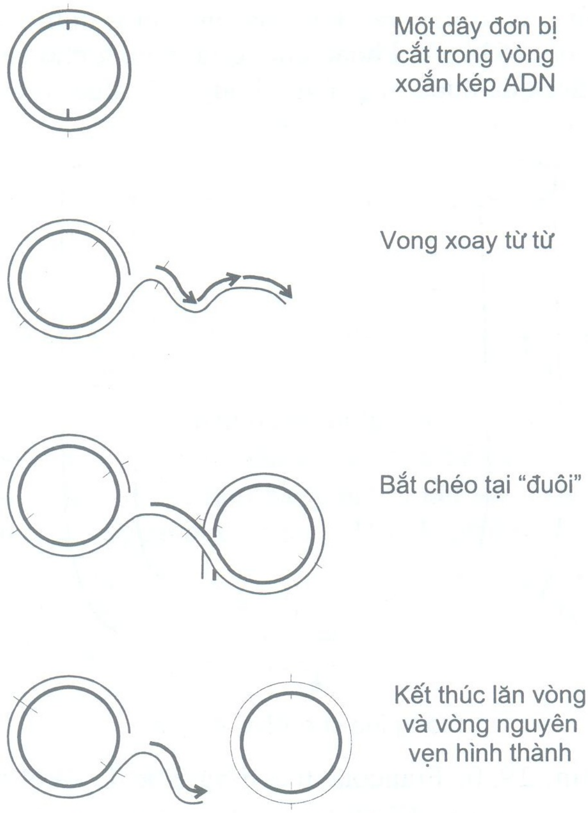
Quá trình này xảy ra ở vi khuẩn thông qua quá trình giao phối-tiếp hợp. Trong khi một mạch của ADN vẫn còn thắt nùi, thì enzym đã bắt đầu cắt sợi kia. Khi đó sợi đứt sẽ "cởi" vòng và đóng vai trò khuôn tổng hợp sợi ADN bổ sung. Sau đó hai sợi tổ hợp lại thành dạng xoắn kép mới. Lúc bấy giờ một nùi nguyên ADN đã quay được 360° và lại được dùng làm khuôn để tổng hợp tiếp sợi bổ sung.

Và như vậy trong tế bào vi khuẩn lúc bấy giờ tồn tại hai nhiễm sắc thể, một chiếc sẽ được sử dụng cho giao phối.

4. SỰ TÁI TỔ HỢP DI TRUYỀN VÀ SỰ TRUYỀN CÁC TÍNH TRẠNG

4.1. Khái niệm

Vi khuẩn hầu như bao giờ cũng là cơ thể đơn bội. Ở chúng chỉ có một tổ hợp gen, đôi khi cũng có những vi khuẩn tạo hợp tử, nhưng những hợp tử này không bao giờ hình thành do sự hợp nhất hoàn toàn hai tế bào, mà chỉ hợp nhất một phần của hai tế bào mà thôi: vật liệu di truyền từ tế bào cho chỉ chuyển một phần qua tế bào nhận, do đó xuất hiện một loại hợp tử không hoàn toàn. Các gen của tế bào cho gọi là các gen ngoại sinh còn các gen của tế bào nhận gọi là các gen nội sinh.



Hình 5.4. Sao chép theo kiểu lăn vòng

Đoạn nhiễm sắc thể của tế bào cho kết đôi với nhiễm sắc thể của tế bào nhận ở đoạn tương ứng và các đoạn riêng lẻ của chúng trao đổi cho nhau. Ở lần phân chia thể nhân và tế bào kế tiếp sẽ tạo ra những tế bào chỉ chứa các nhiễm sắc thể đã được tái tổ hợp.

4.2. Các con đường chuyển ADN từ tế bào cho sang tế bào nhận

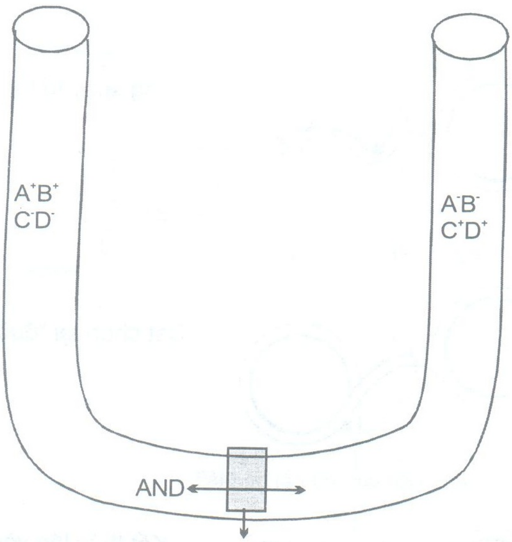
Những đoạn ADN từ tế bào cho có thể vào tế bào nhận bằng các con đường cơ bản sau:

- Tiếp hợp
- Biến nạp
- Tải nạp

Tiếp hợp

Năm 1946, Joshua Lederberg và Edward Tatum (Nobel 1958) đã chứng minh vi khuẩn có khả năng truyền vật liệu di truyền bằng con đường tiếp xúc. Hai ông đã làm thí nghiệm: trộn lẫn hai chủng đột biến *E. coli* K_{12} khuyết dưỡng (autrope) hai loại acid amin: chủng $A^-B^-C^+D^+$ và chủng $A^+B^+C^-D^-$, thì thấy chúng mọc trên môi trường tối thiểu không có 4 loại acid amin A, B, C, D. Tế bào của những khóm mới này có khả năng tổng hợp được 4 loại acid amin nói trên. Tần số tổ hợp là 10^{-6}.

Nếu cấy hai chủng vi khuẩn vào hai nửa ống thủy tinh hình chữ U, ở giữa có màng ngăn không cho các tế bào vi khuẩn chui qua, nhưng cho các phân tử có phân tử lượng lớn như ADN chui qua được, thì cũng không thấy xuất hiện những tế bào có hệ gen tái tổ hợp như trên.



Màng lọc cho AND đi qua

Bằng thực nghiệm, 1950, Francois Jacob và Elie L. Wollman đã chứng minh rằng vi khuẩn tiếp hợp có hai giới. Dĩ nhiên giới "đực" là giới cho ADN và chúng được ký hiệu là những tế bào F^+. Còn tế bào nhận ADN được coi như là tế bào "cái" - tế bào F^-. Jacob và Wollman đã tìm thấy rằng, các tế bào F^- trở thành các tế bào F^+ khi chúng nhận được một lượng tối thiểu ADN. Nhờ đó Wiliam Hayes (1953) đã phát hiện ra yếu tố F (fertility) trong các tế bào cho.

F^-	x	F^-	Không tái tổ hợp
F^+	x	F^-	F^- thành F^+
F^+	x	F^+	Tái tổ hợp được với tần số rất thấp

Ngày nay, các nhà vi sinh vật học hiểu được rằng yếu tố F là một phân tử di truyền (episome) có cấu trúc ADN xoắn kép, mạch vòng nằm ngoài nhiễm sắc thể, có khả năng tự sao chép (replicon). Episome ở F^+ gọi là yếu tố giới tính (sex-factor). Về sau người ta phát hiện ở vi khuẩn còn có nhiều yếu tố khác tương tự episome có khả năng tồn tại độc lập với bộ gen của vi khuẩn.

Thuật ngữ *plasmid* dùng để chỉ những yếu tố đó. *Plasmid* có thể mang từ 2-30 gen. Chúng thường sao chép đồng thời với sự phân bào bằng cơ chế θ hay cơ chế lăn vòng. Có khoảng 12 loại plasmid khác nhau được tìm thấy ở *E. coli*.

Sự truyền ADN từ tế bào này sang tế bào khác qua sự tiếp xúc hai tế bào được gọi là sự tiếp hợp.

Như vậy, yếu tố F có khả năng sao chép độc lập, không liên quan đến những yếu tố di truyền khác (khi tế bào F^+ tiếp hợp với F^- nó vẫn giữ nguyên kiểu gen của mình). Như vậy, nhân tố F không xâm nhập vào hệ gen của vi khuẩn F^+ mà nó tồn tại như một đoạn ADN nằm ngoài nhiễm sắc thể. Các hạt F đã tác động lên một lực đặc biệt gọi là lực tiếp hợp. Chính nhờ lực này mà các tế bào tiếp hợp với nhau. Trong quá trình truyền yếu tố F thì hoàn toàn không có một đoạn ADN nào của nhiễm sắc thể được truyền qua tế bào nhận.

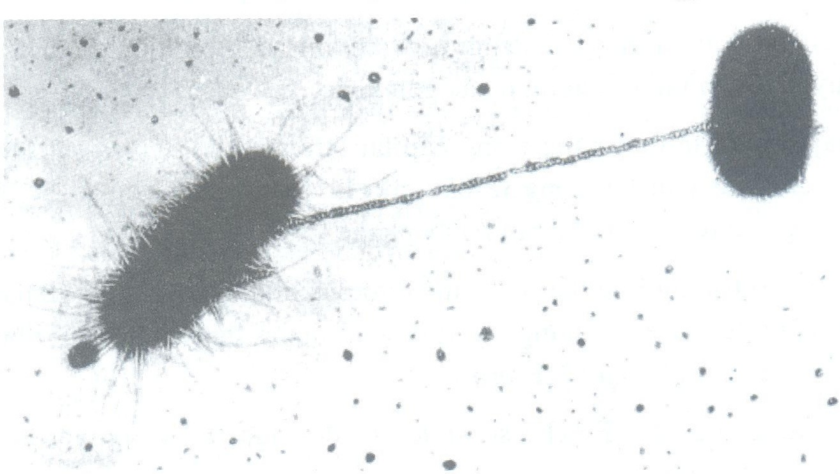
Song, yếu tố F cũng giống như nhiều plasmid khác, nó có thể gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Khi đó nó không còn khả năng sao chép độc lập nữa mà được sao chép bị động cùng với nhiễm sắc thể.

Trên cơ sở này Elie L. Wollman đã phân lập được từ các tế bào F^+ một loại tế bào có khả năng truyền hệ gen vi khuẩn với tần số cao. Khi lai các tế bào này với các tế bào F^- sẽ cho các tế bào tái tổ hợp nhiều hơn hàng nghìn lần so với khi lai F^+ với F^- thông thường. Vì vậy các tế bào này được ký hiệu là Hfr (High frequency of recombination).

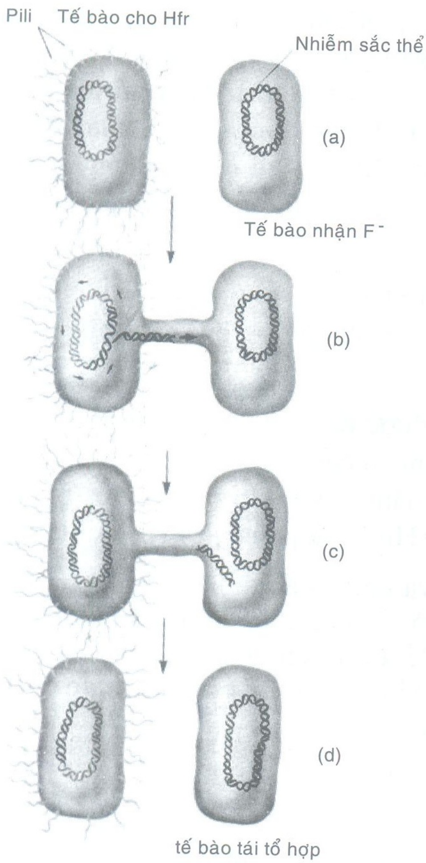
Điều đặc biệt lý thú là các tế bào tái tổ hợp và tất cả các tế bào "cái" còn lại của quần thể đều còn giữ nguyên trạng thái F^-, điều đó có nghĩa là những tế bào Hfr khác với tế bào F^+ ở chỗ là chúng không truyền yếu tố F tự do cho tế bào nhận và khi tiếp hợp chúng chỉ truyền hệ gen mà không hoặc rất ít khi truyền một phần yếu tố F cho tế bào nhận.

– F^+ có thể biến thành F' hoặc Hfr.
– Hfr có thể biến thành F^+.
– F^- không bao giờ trở thành F^+ hoặc Hfr một cách tự phát.

Và như vậy, trong tế bào Hfr thì yếu tố F không tồn tại độc lập mà kết hợp chặt chẽ với hệ gen của vi khuẩn. Vì vậy nó chỉ có khả năng sinh sản cùng với nhiễm sắc thể. Người ta cho rằng, đôi khi ở mức quá độ phải có một đoạn cài nào đó tồn tại trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn để nhận biết yếu tố F.



Hình 5.5. Hai tế bào *E. coli* tiếp xúc nhau trong quá trình tiếp hợp: tế bào có pili là tế bào cho



(a) Tế bào cho Hfr có pili trên mặt tế bào, tế bào nhận F^- không có

(b) Khi sự tiếp hợp bắt đầu, tế bào cho hình thành ống tiếp hợp. Nhiễm sắc thể tế bào cho tháo xoắn và phiên bản một sợi được tổng hợp bằng cơ chế lăn vòng. Một phần của sợi mới chui vào ống tiếp hợp.

(c) Sợi mới xâm nhập tế bào nhận. Khi sợi mới (hay một phần của nó) đi vào tế bào nhận, nó thay thế một đoạn ADN của tế bào nhận. Đoạn bị thay thế thoái hoá và nhiễm sắc thể của tế bào nhận đã được tái tổ hợp

Hình 5.6. Sự tiếp hợp ở vi khuẩn

Trong các tế bào Hfr, yếu tố F thường nằm ở cuối hệ gen và đẩy hệ gen qua cầu pili. Hai tế bào tiếp hợp càng lâu thì các gen từ tế bào cho truyền sang tế bào nhận càng nhiều. Hãn hữu lắm thì toàn bộ hệ gen mới được truyền qua.

Sự truyền gen xảy ra theo một trình tự nhất định và luôn luôn có một số gen nhất định được truyền đi với tần số cao hơn các gen khác.

Hiện nay, người ta thấy rằng trong cặp lai Hfr x F^- đã xảy ra sự đứt nhiễm sắc thể, mà có lẽ chỗ đứt còn lại trong tế bào cho là đoạn mang yếu tố F. Người ta đã chứng minh rằng yếu tố F là một đoạn ADN phage.

Trong một số trường hợp, hạt F có thể được tách khỏi hệ gen vi khuẩn, khi đó tế bào Hfr biến thành tế bào F^+, nhưng hạt F này lại mang theo một đoạn nhiễm sắc thể của vi khuẩn và được gọi là hạt F' (F-prime).

$F'xF^-$ cũng giống như F^+xF^- sẽ sinh sản độc lập trong nguyên sinh chất và thường truyền cho tế bào nhận.

Rõ ràng nhờ F' mà một số tính trạng của tế bào này được truyền qua tế bào khác. Quá trình này được gọi là giới nạp (F-duction hay F-sexduction).

Trong tế bào Hfr, khi tiếp hợp, một sợi của phân tử ADN vòng của nhiễm sắc thể vi khuẩn bị đứt, và mở ra tại đoạn plasmid F và sự sao chép kiểu lăn vòng bắt đầu. Đầu 5' của sợi đơn ADN chuyển từ tế bào Hfr sang tế bào F^-. Sự tái tổ hợp có thể xảy ra giữa nhiễm sắc thể của tế bào nhận và các đoạn của nhiễm sắc thể của tế bào cho với vật liệu mới thay cho vật liệu cũ trong nhiễm sắc thể.

Hiện tượng tiếp hợp còn được tìm thấy giữa các chi khác nhau của vi khuẩn. Thí dụ, tiếp hợp được thấy giữa vi khuẩn Gram âm như Escherichia với Shigella; giữa Salmonella với Serratia; giữa Escherichia với Salmonella.

Vi khuẩn Gram dương cũng có hiện tượng tiếp hợp, thí dụ thấy ở *Streptococcus mutans*, *S. coelicolor*. Tương tự tìm thấy sự tiếp hợp giữa Bacteroides và các loài thuộc chi Clostridium.

Biến nạp

Biến nạp là một thuật ngữ dùng để chỉ những biến đổi tính trạng của vi khuẩn, dưới ảnh hưởng của ADN hòa tan xâm nhập.

Năm 1928, nhà vi khuẩn học người Anh Frederick Griffith đã phát hiện thấy sự biến đổi khuẩn lạc dạng R (rough-nhăn nheo) không có nang của *Diplococcus pneumoniae* thành dạng S (smooth-trơn) có khả năng tạo nang.

Dạng S gây bệnh có nang bằng polysaccharid, cản trở bạch cầu phá vỡ tế bào. Dạng này tạo khuẩn lạc trơn láng trên mặt thạch.

Dạng R, không gây bệnh, không có nang, tạo khuẩn lạc nhăn nheo.

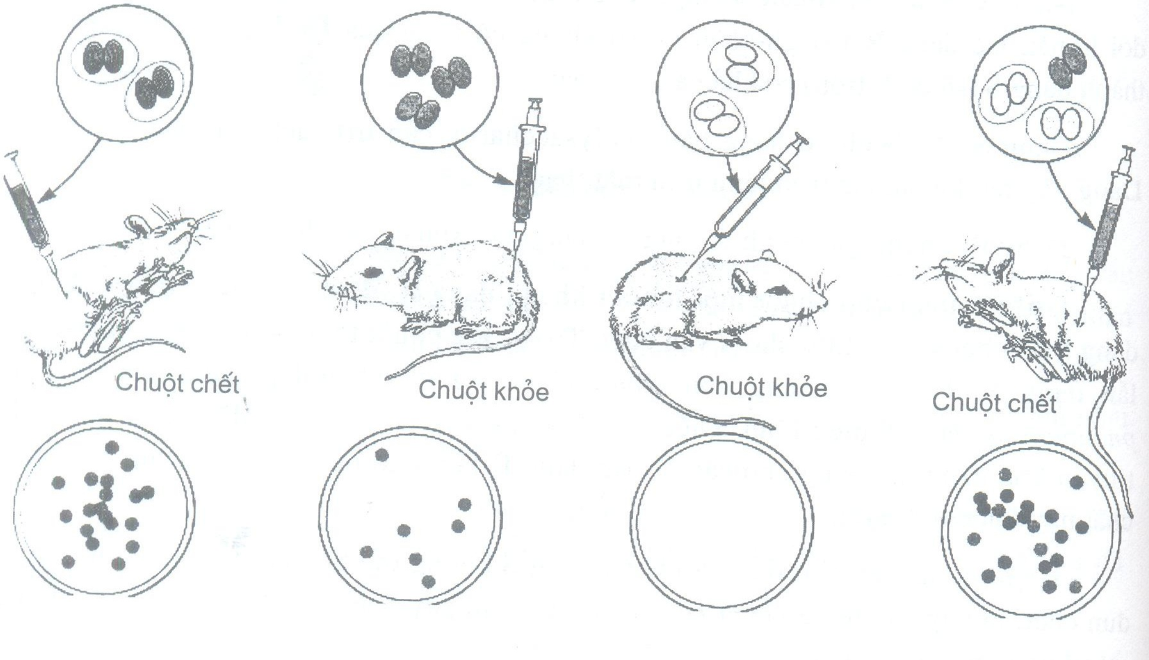
Griffith tiêm cho chuột một liều vi khuẩn dạng R, đồng thời một liều vi khuẩn dạng S đã chết vì nhiệt thì chuột vẫn chết. Trong xác chuột thấy có vi khuẩn cả dạng R lẫn dạng S. Từ máu những con chuột chết ông đã phân lập được *Diplococcus pneumoniae* dạng S điển hình. Điều đó có nghĩa vi khuẩn dạng S đã chết vì nhiệt đã truyền khả năng tạo nang cho các tế bào dạng R làm cho nó trở thành dạng S và tính chất này được di truyền.

Hiện tượng trên cho thấy vi khuẩn dạng S không thể tự sống lại được sau khi bị đun chết, nhưng các tế bào chết này đã truyền tính gây bệnh cho tế bào R. Hiện tượng này được gọi là biến nạp.

Năm 1944, T. Avery, Mc. Leod và Mc. Carty đã tiến hành thí nghiệm xác định rõ tác nhân gây biến nạp là gì. Nếu các tế bào S bị xử lý bằng protease (enzym phân hủy protein) hoặc ARN -ase (enzym phân hủy ARN) thì hoạt tính biến nạp vẫn còn, chứng tỏ protein và ARN không phải là tác nhân gây biến nạp. Nhưng nếu tế bào chết bi xử lý bằng ADN -ase (enzym phân hủy đặc hiệu ADN) thì hoạt tính biến nạp không còn nữa, chứng tỏ ADN là tác nhân biến nạp.

Các nhà khoa học hiện thời xác nhận rằng biến nạp là một phương pháp quan trọng trong việc tái tổ hợp vi khuẩn tuy rằng chỉ xảy ra ở 1% quần thể.

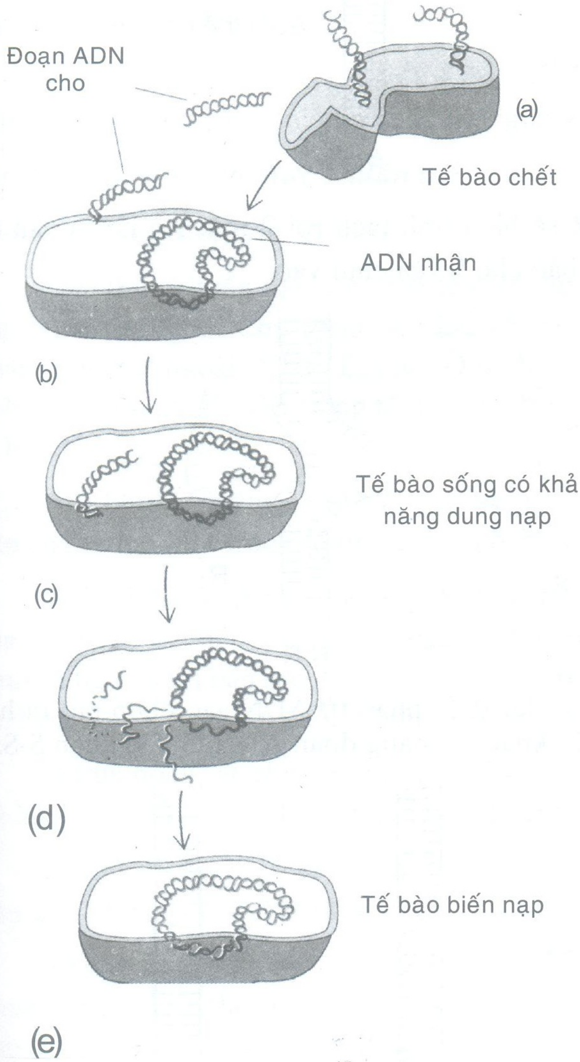
Kích thước của các đoạn ADN được truyền từ tế bào cho qua thành tế bào và màng của tế bào nhận thường có phân tử lượng 10^6-10^7 dalton chứa 10-20 gen. Các đoạn có phân tử lượng nhỏ hơn không có khả năng biến nạp. Mỗi đoạn biến nạp bằng 1/200 đến 1/500 hệ gen của tế bào cho. Nói cách khác là trong quá trình hình thành ADN biến nạp, hệ gen của tế bào đã bị đứt ra thành 200 đến 500 đoạn nhỏ. Có giả thuyết cho rằng tế bào nhận đến 10 đoạn thì bão hòa. Có thể do bề mặt của tế bào vi khuẩn có các vị trí tiếp nhận gọi là thụ thể tiếp nhận một cách có chọn lọc các đoạn ADN xoắn kép có trọng lượng phân tử tương ứng.



Hình 5.7. Thực nghiệm biến nạp của Griffith

Một điều quan trọng của biến nạp là tế bào nhận phải có trạng thái sinh lý đặc biệt để nhận đoạn ADN, được gọi là khả năng dung nạp (competence). Khả năng này được xác định như khả năng thu nhận ADN từ môi trường. Các yếu tố tác động đến bề mặt tế bào đóng vai trò quan trọng đối với khả năng dung nạp, trên thực tế nó làm thay đổi khả năng thấm qua màng hoặc là những thụ thể bề mặt.

Ngày nay, người ta đã tìm thấy hiện tượng biến nạp ở *Haemophilus influenzae, Neisseria, Azotobacter, Rhizobium, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Agrobacterium radiobacter, E. coli* K12 ...



(a) Một đoạn ADN được phóng thích từ vi khuẩn bị hủy

(b) và được tế bào sống có khả năng dung nạp bắt lấy

(c) Một khi đi qua thành và màng của tế bào nhận, một sợi ADN của nó tan

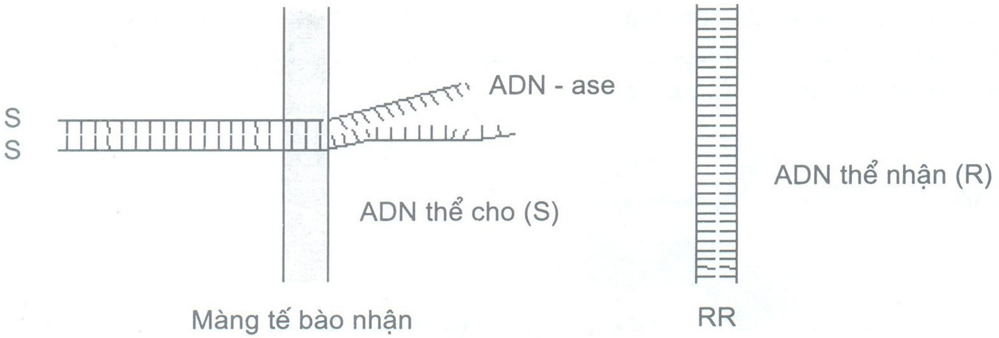
(d) và để lại một sợi được hợp nhất

(e) Một sợi ADN của tế bào nhận tách khỏi nhiễm sắc thể và được thay bằng sợi của tế bào cho. Tế bào bấy giờ được xem là đã biến nạp. Sự phân đôi của tế bào sẽ cho ra những tế bào biến nạp khác.

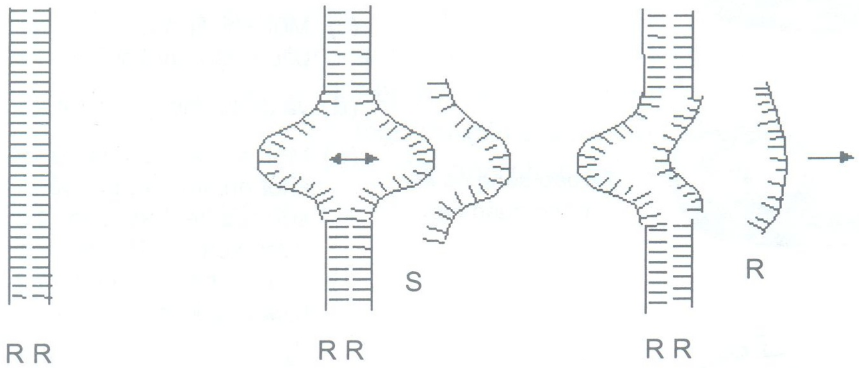
Hình 5.8. Biến nạp của vi khuẩn

Người ta chia quá trình biến nạp thành ba giai đoạn:

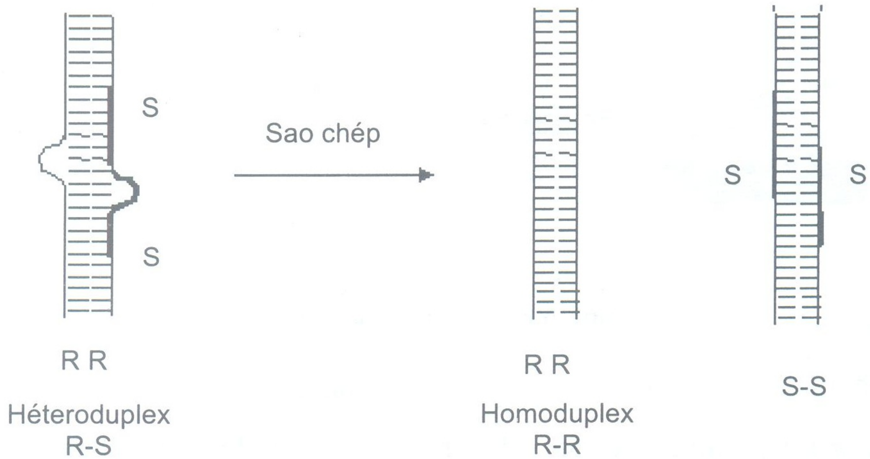
– ***Thâm nhập của ADN:*** Sợi ADN mạch kép của dòng vi khuẩn S sau khi chui qua màng tế bào của dòng R thì một mạch S sẽ bị nuclease của tế bào nhận cắt, còn lại một mạch nguyên.



– ***Bắt cặp:*** ADN của tế bào nhận R sẽ biến tính tách rời 2 mạch ở một đoạn để bắt cặp với một đoạn ADN của tế bào cho S vừa chui vào.



– ***Sao chép:*** Sau khi bắt cặp tạo đoạn lai R-S, phân tử ADN sao chép tạo ra hai sợi, một sợi kép R-R và một sợi kép khác có mang đoạn ADN tế bào nhận S-S.



Tải nạp

Tải nạp là hiện tượng chuyển ADN từ tế bào cho sang tế bào nhận nhờ thực khuẩn thể. Thường khi tham gia vào hiện tượng này, phage chỉ chuyển một đoạn nhỏ ADN của tế bào cho. Tải nạp được thực hiện bởi virus ôn hòa.

Năm 1952, Joshua Lederberg và Norton Zinder đã phát hiện ra hiện tượng tải nạp không đặc hiệu hay còn gọi là tải nạp chung trên chủng *Salmonella typhimurium* đột biến. Tuy chưa nhìn thấy được, nhưng hoạt động của thực khuẩn thể đã được Frederick Twort mô tả năm 1915, sau đó hai năm thì Felix d'Herelle cũng mô tả chi tiết.

Các nghiên cứu thực khuẩn thể ở tế bào *E. coli* cho thấy chúng có hai cơ chế sinh sản trong tế bào vi khuẩn: chu trình tiêu giải và chu trình tiêu giải tiềm ẩn.

Cơ chế sinh sản của thực khuẩn thể

Chu trình tiêu giải (lytic circle)

Các thực khuẩn thể làm chết tế bào chủ gọi là phage độc và chúng sinh sản theo chu trình tiêu giải. Chu trình bắt đầu khi sợi đuôi của thực khuẩn thể gắn vào điểm nhận trên mặt ngoài tế bào *E. coli*. Ống đuôi co lại tạo lỗ thủng xuyên thành và màng tế bào và bơm ADN vào trong tế bào, capsid rỗng của thực khuẩn thể còn lại bên ngoài tế bào.

Sau khi bị nhiễm, tế bào *E. coli* nhanh chóng thực hiện phiên mã và dịch mã các gen của virus. Một trong những enzym đầu tiên được tạo ra sẽ cắt ADN của tế bào chủ.

Khi ADN của tế bào chủ bị phân hủy, bộ gen của virus kiểm soát toàn bộ hoạt động của tế bào để tạo ra các cấu phần của nó. Các nucleotid được dùng để sao chép ADN của virus ra hàng trăm bản sao. Các protein của capsid được tổng hợp thành ba phần riêng: đầu đa diện, ống đuôi và sợi đuôi. Chúng tự ráp lại với nhau thành virion con.

Virus hoàn tất chu trình khi enzym lysozym được tạo ra để phá vỡ vách tế bào. Tế bào vi khuẩn bị vỡ, 100-200 virion thoát ra và lặp lại chu trình mới.

Toàn bộ chu trình từ lúc thực khuẩn thể tiếp xúc bề mặt tế bào đến khi tế bào bị tiêu giải khoảng 20-30 phút ở 37°C.

Các tế bào vi khuẩn và thực khuẩn thể ký sinh có ***sự đồng tiến hóa***. Các tế bào vi khuẩn có các cơ chế bảo vệ như biến đổi màng tế bào để thực khuẩn thể không bám vào được hoặc các enzym cắt giới hạn cắt các ADN của thực khuẩn thể . Thực khuẩn thể cũng biến đổi để xâm nhập được vào vi khuẩn.

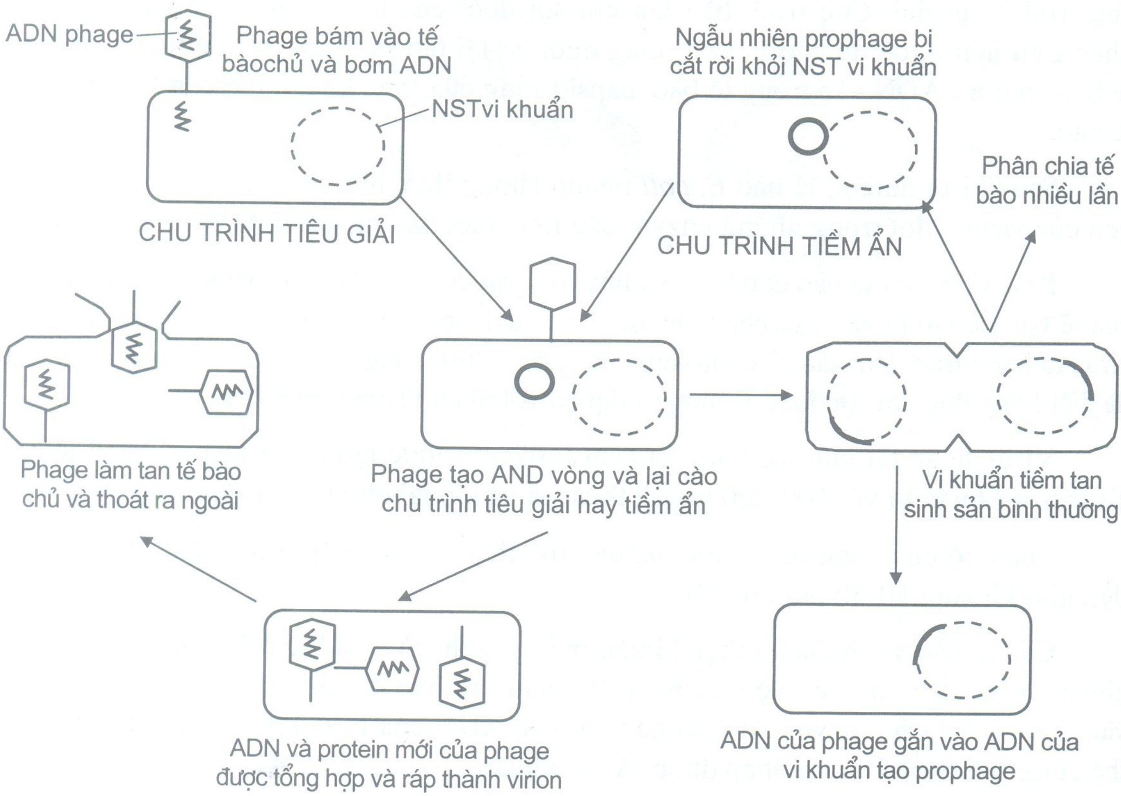
Có trường hợp cả hai cùng tồn tại như trong chu trình tiêu giải tiềm ẩn.

Chu trình tiêu giải tiềm ẩn (lysogenic circle)

Các phage sinh sản mà không làm chết các tế bào chủ gọi là phage ôn hòa. Chúng có hai khả năng sinh sản: chu trình tiêu giải và tiêu giải tiềm ẩn không làm chết tế bào chủ.

Chu trình tiêu giải tiềm ẩn được nghiên cứu ở phage như sau: chu trình sống của virus bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào *E. coli* và bơm ADN vào. ADN của phage T_4 sau khi được bơm vào tế bào *E. coli* sẽ tạo vòng tròn và sẽ tham gia vào một trong hai chu trình. ADN của phage có thể trực tiếp đi vào chu trình tiêu giải hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhờ tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt để khởi đầu chu trình tiêu giải tiềm ẩn. Khi bộ gen của phage gắn vào bộ gen của vi khuẩn, nó được gọi là prophage. Trong quá trình sinh sản của tế bào vi khuẩn, ADN của phage cũng được sao chép và chia đều về các tế bào con như ADN của vi khuẩn. Một tế bào bị nhiễm có thể nhanh chóng sinh ra nhiều tế bào vi khuẩn chứa prophage.

Đôi khi prophage có thể tách ra khỏi ADN của vi khuẩn một cách ngẫu nhiên hoặc do tác động của phóng xạ hay hóa chất. Prophage được tách rời ra độc lập trở thành phage rồi bắt đầu chu trình tiêu giải.



Hình 5.9. Chu trình tiêu giải (tan) và tiêu giải tiềm ẩn (tiềm tan) của thực khuẩn thể

Các kiểu tải nạp

Có hai loại tải nạp.:

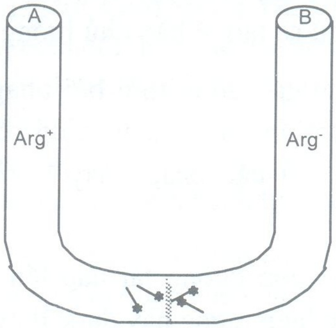
– Tải nạp không đặc hiệu hay tải nạp chung (generalized transduction) là tải nạp do phage độc thực hiện, có chu trình tiêu giải, có thể truyền bất kỳ đoạn ADN nào từ tế bào cho sang tế bào nhận.

– Tải nạp hạn chế hay tải nạp đặc hiệu (specialized transduction) là tải nạp chỉ truyền những đoạn ADN nhất định. Đây là kết quả của chu trình tiêu giải tiềm ẩn, là giai đoạn ADN của phage được sát nhập vào ADN của vi khuẩn.

Tải nạp không đặc hiệu

Người ta dùng hai chủng đột biến của *Salmonella typhimurium* về khả năng tổng hợp arginin. Chủng tổng hợp được arginin được ký hiệu là Arg^+, còn chủng không tổng hợp được ký hiệu là Arg^-.

Thí nghiệm được tiến hành trong ống chữ U, ở đáy ống hai phần được ngăn cách với nhau bằng một màng lọc vi khuẩn. Màng không cho vi khuẩn lọt qua nhưng cho phage lọt qua. Nhánh A chứa vi khuẩn Arg^+, còn nhánh B chứa vi khuẩn Arg^-.



Sau một thời gian nuôi cấy, bên nhánh B xuất hiện vi khuẩn có khả năng tổng hợp arginin. Qua nhiều lần thí nghiệm người ta thấy phage đã tải gen Arg^+ từ nhánh A sang nhánh B. Tần số xuất hiện các tế bào Arg^+ này khoảng 10^{-5}.

Thực ra, tải nạp chung xảy ra khi phage mang bất kỳ gen nào của vi khuẩn A sang vi khuẩn B. Tải nạp chung có các đặc điểm: thường do phage kiểu P1 thực hiện; bất kỳ gen nào của vi khuẩn cũng đều được tải nạp. Tải nạp có được do gói nhầm ADN của tế bào chủ khi phage trưởng thành; các thể tái tổ hợp đơn bội được tạo ra.

Người ta ước lượng rằng bằng tải nạp, đoạn ADN do phage gắn vào không vượt quá 1-2% hệ gen của vi khuẩn. Rất ít khi phage có thể truyền cùng lúc hai tính trạng hoặc trong một số trường hợp hoàn toàn không có khả năng thực hiện điều đó. Vì hệ gen của vi khuẩn dài hơn hệ gen của phage tới 100 lần, do đó chỉ có các gen nằm cách nhau không quá 1/100 chiều dài hệ gen mới có thể truyền đi cùng nhau. Hay chỉ những gen liên kết chặt chẽ với nhau mới có khả năng cùng nhau truyền sang tế bào nhận.

Tải nạp đặc hiệu

Là tải nạp chỉ liên quan đến một cụm gen vi khuẩn nhất định, chẳng hạn phage lamda (phage λ) luôn luôn bám vào gần cụm gen Gal^+ trên nhiễm sắc thể vi khuẩn tạo cấu trúc λ-Gal^+, là cụm gen chịu trách nhiệm lên men đường galactose và tiến hành tải nạp gen Gal^{+} vào tế bào nhận Gal^{-}. Trong khi đó phage lại bám vào gần cụm gen Try^{+} và tiến hành tải nạp gen tổng hợp tryptophan.

Trong các tế bào sinh tan, phage trưởng thành chuyển thành prophage, còn dưới tác dụng của các nhân tố kích thích thì prophage lại biến thành phage trưởng thành (tách khỏi nhiễm sắc thể vi khuẩn).

Tải nạp đặc hiệu có các đặc điểm: những gen được chuyển nằm sát chỗ prophage gắn vào, các vi khuẩn tái tổ hợp có thể lưỡng bội một phần.

Phage λ gắn vào bộ gen vi khuẩn giữa 2 gen *gal* (đồng hoá galactose) và *bio* (tổng hợp biotin). Đầu của prophage chỉ có thể chứa được gen *gal* hay *bio*. Phage λ tải nạp được gen *gal* thì gọi là λ *gal* hay λ dg (d= defective, khuyết; g= galactose). Nếu tế bào *gal*$^{-}$ được nhiễm bởi λ dg thì sẽ tạo tế bào chủ lưỡng bội một phần (*gal*$^{-}$ -λ- *gal*$^{+}$).

Nếu tế bào vi khuẩn được gây đồng thời bởi phage λ hoang dại và phage λ dg, thì phage λ hoang dại sẽ hỗ trợ làm cho phage λ dg chuyển gen *gal*$^{+}$ cho tế bào *gal*$^{-}$ với tần số cao hơn. Người ta gọi các phage này là tải nạp tần số cao (Hft = high frequency of transduction).

Sự truyền tính trạng bằng con đường tải nạp lần đầu tiên được quan sát thấy ở *Salmonella typhimurium*. Về sau hiện tượng này được thấy ở các chi Escherichia, Shigella, Bacillus, Pseudomonas, Staphylococcus và Vibrio.

Yếu tố di truyền vận động

Tái tổ hợp di truyền thường xảy ra trong tự nhiên, có hai loại. Một là do trao đổi giữa các đoạn cùng nguồn của ADN. Khi hai đoạn ADN của sợi kép được xếp thẳng hàng, xảy ra sự trao đổi giữa các phân tử, trong đó các gen có thể được truyền từ phân tử này cho phân tử kia. Hiện tượng này là sự tái tổ hợp ở tế bào nhân thật, kết quả của sự trao đổi chéo và do sự tiếp hợp, biến nạp và tải nạp ở tế bào nguyên thủy.

Khi nghiên cứu nhiễm sắc thể vi khuẩn, plasmid và virus, người ta đã thừa nhận một kiểu chuyển gen thứ hai. Đó là sự chèn hay còn gọi là sự xen cài của yếu tố di truyền vận động (và có thể di chuyển). Plasmid F và phage (là những thí dụ trước). Ngày nay còn có hai loại yếu tố di truyền vận động khác đã được thừa nhận là đoạn chèn và gen nhảy.

Đoạn chèn

Phần lớn đột biến xảy ra trong vi khuẩn là do thay thế một nucleotid này bằng một nucleotid khác. Phân tích bản đồ nhiễm sắc thể *E. coli* ngày càng chi tiết hơn, người ta đã phát hiện một nguồn đột biến lớn khác, đó là sự liên tục của gen bị gián đoạn bởi một đoạn ngắn ADN chen vào. Các đoạn giống nhau thường chuyển thành các thể đột biến khác nhau, độc lập nhau. Các đoạn chèn dao động từ 600 đến 6.000

cặp base và chúng không tồn tại độc lập trên nhiễm sắc thể vi khuẩn, trên virus và plasmid. Chúng có một tính chất rất kỳ lạ: trên nhiễm sắc thể chúng có thể sinh ra những bản sao của bản thân chúng, từ đó có thể chèn vào bất cứ đâu trên cùng phân tử ADN. Mặc dù chúng được xem là di động, nhưng chúng thường không di chuyển theo hướng rời nhiễm sắc thể. Thí dụ IS 6110 thường gặp 10 lần lặp lại trên nhiễm sắc thể vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Gen nhảy

Khi hai đoạn chèn xâm nhập vào một đoạn ADN thì toàn bộ đoạn ADN có thể di chuyển từ chỗ này sang chỗ khác trên nhiễm sắc thể này hay sang nhiễm sắc thể khác dưới dạng bản sao tạo ***gen nhảy***.

Năm 1951, tại phòng thí nghiệm 'Cold Spring Harbor' ở Long Island (New York), bà Barbara Mc Clintock dựa trên sự biến đổi màu sắc và các biến dị trên phôi của hạt ngô nảy mầm, đã xác định được các yếu tố kiểm soát hiện tượng này: thay đổi vị trí trong hệ gen của quá trình phát triển phôi và các biến đổi ấy có tác động sâu sắc lên sự biểu hiện của các gen đặc thù. Đó là hiện tượng các gen nhảy. Mặt khác, gen nhảy có thể tự tách ra một cách ngẫu nhiên khỏi chỗ gắn vào để phục hồi trình tự hoang dại ban đầu.

Gen nhảy khác với đoạn chèn ở chỗ: chúng có thể phát hiện qua kiểu hình, chức năng của chúng như là gen và chúng cần đoạn chèn để di chuyển.

Ngày nay, người ta lại biết một số gen kháng là gen nhảy, do đó ta hiểu vì sao chúng có thể nhảy dễ dàng từ plasmid này sang plasmid khác và từ plasmid sang nhiễm sắc thể vi khuẩn và ngược lại.

Gần đây người ta mới phát hiện một gen nhảy dùng làm khóa đóng mở sự tổng hợp protein. Vi khuẩn Salmonella có thể tổng hợp một trong hai loại protein tiêm mao. Những tiêm mao này làm cho tế bào vi khuẩn di động được và có tính kháng nguyên. Gen được biểu hiện là do một đoạn 950 cặp base của ADN, điều hòa một operon nhỏ mã hóa một tiêm mao và một chất ức chế của gen đối với một tiêm mao khác. Nếu đoạn 950 cặp base này hướng về một chiều thì protein tiêm mao thứ nhất được tổng hợp và protein tiêm mao thứ hai bị ức chế. Nếu hướng về chiều ngược lại thì chất ức chế không được tạo ra và protein tiêm mao thứ hai được tổng hợp. Thật ra đoạn điều hòa là một gen nhảy, được dùng như một khóa hãm bật ngón tay.

Đoạn chèn và gen nhảy có hai đặc tính cơ bản:

- Sự di chuyển của chúng có liên quan tới sự nhân đôi. Trình tự ban đầu vẫn nằm ở vị trí cũ, nhưng một bản sao thứ hai lại nằm ở vị trí khác của bộ gen. Quá trình đó gọi là sự dời chỗ.
- Sự dời chỗ thực hiện trên rất nhiều vị trí trên bộ gen, không đòi hỏi có sự tương đồng cần thiết giữa các trình tự nucleotid của đoạn dời chỗ với nơi được dời đến.

Sau khi phát hiện ở *E. coli* một số loại IS_1 và IS_2 điều khiển tốc độ sao mã của các operon lactose và galactose, người ta cũng thấy gen nhảy ở nấm men, ruồi dấm.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Nhiễm sắc thể vi khuẩn là:

   a. 1 phân tử ADN vòng kín

   b. 1 mesosome

   c. 1 phân tử ADN thẳng

   d. a và c đúng

2. Vi khuẩn là:

   a. Thể lưỡng bội

   b. Thể đơn bội

   c. Hợp tử toàn phần

   d. Tất cả đều sai

3. Quá trình tiếp hợp:

   a. Là quá trình phân tử ADN cho tiếp xúc với phân tử ADN nhận

   b. Có thể xảy ra giữa các tế bào vi khuẩn bất kỳ với tần số thấp

   c. Là quá trình tiếp xúc giữa tế bào vi khuẩn và vật liệu di truyền của môi trường bên ngoài

   d. Là quá trình truyền ADN thông qua tiếp xúc giữa các vi khuẩn

4. Plasmid:

   a. Qui định các tính trạng liên quan đến tính sống còn của sinh vật

   b. Là 1 episome, có cấu trúc vòng

   c. Là 1 phân tử ARN, tồn tại độc lập với bộ gen vi khuẩn

   d. Không tồn tại ở chủng vi khuẩn hoang dại

5. Yếu tố F:

   a. Qui định giới tính của vi khuẩn

   b. Qui định hình thành các pili và pilus

   c. Có khả năng di truyền

   d. Tất cả

6. Tế bào F^+ có khả năng:

   a. Truyền yếu tố F theo cơ chế theta

   b. Tiếp hợp với tế bào F^-, Hfr, F^+, F'

   c. Truyền đoạn ADN nhiễm sắc thể từ tế bào cho sang tế bào nhận theo cơ chế lăn vòng

   d. Tất cả

7. Tế bào Hfr:

   a. Yếu tố F nằm trên nhiễm sắc thể vi khuẩn

   b. Yếu tố F tách khỏi nhiễm sắc thể vi khuẩn và mang theo 1 đoạn nhiễm sắc thể vi khuẩn

c. Không có khả năng tiếp hợp

d. Truyền yếu tố di truyền qua trung gian thực khuẩn thể với tần số cao

8. Vi khuẩn và phage có sự đồng tiến hoá, bởi vì:

a. Các tế bào vi khuẩn có các cơ chế bảo vệ, chống lại sự xâm nhập của phage

b. Để sinh tồn và phát triển, các phage cũng biến đổi theo các biến đổi của các tế bào để xâm nhập được vào tế bào vi khuẩn

c. Tuân theo qui luật giao phối

d. Vi khuẩn hoàn thiện thì phage cũng hoàn thiện về mặt cấu tạo

e. a, b, d

9. Tải nạp đặc hiệu do chu trình:

a. Tiêu giải

b. Sinh tan

c. Tiêu giải tiềm ẩn

d. Phá hủy tế bào vi khuẩn

e. Phage

10. Hợp tử tạo ra do hợp nhất không hoàn toàn hai tế bào là:

a. Zygote

b. Hợp tử hoàn toàn

c. Merozygote

d. Hợp tử không hoàn toàn

e. c, d

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Phạm Thành Hổ. ***Di truyền học.*** 1998. NXB Giáo dục.
2. Phạm Thành Hổ. ***Sinh học đại cương.*** 1996. ĐH KHTN.
3. Werner Braun. ***Di truyền học vi khuẩn.*** 1976. NXB KH và KT.

Phần II

KHÁI NIỆM MIỄN DỊCH HỌC

Bài 6

SỰ LIÊN HỆ GIỮA VẬT CHỦ VÀ VI KHUẨN

MỤC TIÊU

1. *Nắm được mối liên hệ giữa vi khuẩn và vật chủ.*
2. *Phân biệt được vi khuẩn gây bệnh cơ hội và vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt.*
3. *Xác định được các yếu tố giúp vi khuẩn gây bệnh ở ký chủ.*

1. ĐẠI CƯƠNG

Trong cuộc sống, con người tiếp xúc với các hệ sinh thái của vi khuẩn như: đất, nước, không khí... Các vi khuẩn sống ngoại sinh có thể không gây bệnh cho người.

Con người cũng là hệ sinh thái của vi khuẩn, những vi khuẩn này gọi là vi khuẩn nội sinh. Người có thể phóng thích vi khuẩn ra ngoài gây nhiễm hệ ngoại sinh.

1.1. Vi khuẩn ngoại sinh

Là những vi khuẩn sống trong tự nhiên bằng chất cặn bã hữu cơ do hủy hoại từ thực vật hay động vật. Đây là những vi khuẩn có vai trò trong các chu kỳ nitơ, carbon, lưu huỳnh ở đất.

1.2. Vi khuẩn nội sinh

Là những vi khuẩn sống được bằng cách bám vào tế bào người hay động, thực vật để dùng những chất cặn bã phóng thích từ các tế bào này; thông thường là các tế bào bên ngoài như biểu mô, các niêm mạc ở ruột, đường hô hấp (hệ vi khuẩn cổ họng, đường ruột, da ...).

Hội sinh: Cả vi khuẩn và vật chủ đều không có lợi và cũng không có hại. Ví dụ: *Staphylococcus epidermidis* sống trên da của người.

Cộng sinh: Khi vi khuẩn và vật chủ đều có lợi. Ví dụ: hệ vi khuẩn ở ruột người sống nhờ thức ăn trong ruột, ngược lại vi khuẩn sản xuất vitamin cho người sử dụng. Giữa các loài vi khuẩn trong hệ vi khuẩn ở ruột có sự cân bằng động. Nếu mất sự cân bằng này có thể gây viêm ruột. Một trong những nguyên nhân là do sử dụng kháng sinh phổ rộng với liều cao và kéo dài diệt các vi khuẩn nhạy cảm với kháng sinh như: *E.coli*, Lactobacillus... và để lại những loài vi khuẩn không nhạy cảm như Proteus, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, nấm men Candida với tỷ lệ cao hơn bình thường, gây viêm ruột dẫn đến tiêu chảy gọi là tiêu chảy do loạn khuẩn.

Ký sinh: Vi khuẩn gây hại cho tế bào vật chủ, dẫn đến hủy hoại tế bào nhưng ngược lại vi khuẩn cũng có thể bị tiêu diệt bởi sự thực bào.

1.3. Các loại vi khuẩn gây bệnh

Vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt

Đây là những vi khuẩn gây bệnh nhiễm với những triệu chứng bệnh lý, lâm sàng xác định rõ ràng, chuyên biệt.

Ví dụ: vi khuẩn gây bệnh lậu, sốt thương hàn, lao ... .

Vi khuẩn gây bệnh cơ hội

Sự hiện diện của chúng trên cơ thể thường không gây bệnh. Phần lớn chúng là vi khuẩn cộng sinh. Tuy nhiên chúng có thể gây bệnh khi có sự thay đổi thể trạng như cơ thể suy yếu, sự suy giảm hệ thống miễn dịch và có cửa ngõ cho chúng xâm nhập.

2. NĂNG LỰC PHÁT SINH BỆNH NHIỄM

1.2. Đại cương

Năng lực phát sinh bệnh nhiễm phụ thuộc vào sự phòng vệ và sự nhiễm khuẩn.

Phòng vệ bệnh nhiễm

Con người và động vật tồn tại được cho đến hiện nay là do có những tuyến phòng vệ của cơ thể để loại vi khuẩn.

- Phòng vệ bên ngoài: da, niêm mạc.
- Phòng vệ bên trong: phòng vệ không chuyên biệt do tế bào (thực bào) hay phòng vệ chuyên biệt do kháng thể và miễn dịch trung gian tế bào.

Sự nhiễm khuẩn

Trong quá trình cạnh tranh giữa vi khuẩn và vật chủ có thể xảy ra những trường hợp sau:

a. *Nếu vi khuẩn thắng* nghĩa là gây nguy hại cho tế bào vật chủ, tạo được bệnh nhiễm, gọi là sự nhiễm trùng (infection).

b. *Nếu sự phòng vệ của cơ thể giới hạn* được ở một nơi nào gọi là sự nhiễm mầm bệnh (infectation). Ví dụ: người mang vi khuẩn lao nhưng không bị bệnh lao.

c. *Nếu sự phòng vệ làm giảm sự độc hại* của vi khuẩn là trường hợp gây bệnh nhiễm không biểu lộ.

d. *Nếu sự phòng vệ thắng* vi khuẩn, khi đó vật chủ miễn nhiễm.

Bệnh nhiễm do vi khuẩn là kết quả của việc vi khuẩn đã thắng trong cuộc xung đột giữa vi khuẩn và vật chủ. Vi khuẩn thì tìm cách xâm lấn mô còn vật chủ thì phản ứng lại để thải hay diệt chúng.

Vậy năng lực phát sinh bệnh nhiễm tùy thuộc vào các yếu tố vi khuẩn và vật chủ. Nếu vi khuẩn gây được bệnh nhiễm thì gọi là vi khuẩn độc (virulent).

2.2.Yếu tố vi khuẩn

Khả năng gây bệnh

Là khả năng của vi khuẩn có thể xâm nhập vật chủ xuyên qua các tuyến phòng vệ và tạo được bệnh nhiễm ở vật chủ. Loại vi khuẩn không gây bệnh không qua được các tuyến phòng vệ.

Cơ chế gây bệnh nhiễm của vi khuẩn

Vi khuẩn muốn gây bệnh nhiễm phải có lực độc bao gồm khả năng xâm lấn, tạo enzym và độc tố. Như vậy, vi khuẩn gây bệnh theo hai cơ chế:

Sự xâm lấn

Các yếu tố của lực độc:

- Vi khuẩn phải gắn vào tế bào vật chủ

Một số cấu trúc mặt ngoài của vi khuẩn có nhiệm vụ trong việc gắn vi khuẩn vào tế bào vật chủ.

- Pili thường có ở vi khuẩn Gram âm có chứa lectin có khả năng gắn chuyên biệt với các đường của các glycolipid hay glycoprotein của màng tế bào vật chủ.
- Glycocalyx có ở một số vi khuẩn giúp vi khuẩn gắn vào tế bào vật chủ.
- Ở một số chủng Streptococcus có protein M ở thành tế bào giúp vi khuẩn gắn được vào niêm mạc yết hầu.

- Vi khuẩn phải kháng sự thực bào, do:

- Có nang: ví dụ phế cầu khuẩn có nang thì độc, không có nang không độc.
- Có nhiều lipid đặc biệt: vi khuẩn lao có 60% lipid do đó không bị thực bào. Bạch cầu đánh bắt vi khuẩn lao nhưng không diệt chúng.

- Vi khuẩn có enzym tấn công:

Ví dụ: *Staphylococcus aureus* có coagulase (+) làm đông huyết tương tạo một vách fibrin xung quanh tiêu điểm nhiễm trùng chống lại sự thực bào.

- Một số enzym giúp vi khuẩn dễ xâm lấn:

– Hyaluronidase: Enzym thủy phân acid hyaluronic giúp vi khuẩn khuếch tán. Acid hyaluronic là chất gắn các tế bào của mô liên kếte

– Kinase: Thủy phân sợi huyết.

– Collagenase: Thủy phân collagen.

- Vi khuẩn phải sinh sản được trong mô:

Trong thực nghiệm, vi khuẩn tăng trưởng nhanh chóng *in vitro*. Nhưng thực tế trong bệnh nhiễm ở người, vi khuẩn nhân đôi khó khăn trong mô và máu, sự tăng trưởng *in vivo* rất yếu so với *in vitro*. Ví dụ: vi khuẩn thương hàn có thời gian thế hệ là 20 phút *in vitro* nhưng *in vivo* là 8 giờ.

Mặc dù vậy, vi khuẩn có thể tăng trưởng tốt ở những mô có ái lực. Trong viêm màng não tủy, có nhiều màng não cầu và ở bệnh lao, có nhiều vi khuẩn lao trong hốc phổi.

Ước lượng lực độc

- ID50 (Infection Dose) và LD50 (Lethal Dose)

– ID50 là số lượng vi khuẩn gây nhiễm 50% thú thử nghiệm.

– LD50 là số lượng vi khuẩn gây chết 50% thú thử nghiệm.

ID50 và LD50 giúp nhận định thay đổi lực độc.

- Sự thay đổi lực độc

– Giảm lực độc: Một gốc vi khuẩn độc trích từ bệnh phẩm sẽ giảm độc hay hết độc khi cấy nhiều lần qua môi trường. Đây là nguyên tắc tạo vaccin BCG do vi khuẩn lao bò độc cấy nhiều lần qua môi trường nên hết độc.

– Gia tăng lực độc: Nếu di chuyển vi khuẩn nhiều lần qua thú thì vi khuẩn sẽ gia tăng lực độc đối với thú đó. Trong dịch bệnh vi khuẩn được truyền sang nhiều người nên ngày càng trở nên độc.

– Gia tăng lực độc đối với thú nhưng yếu đối với người: Một gốc vi khuẩn di chuyển nhiều lần qua thú có thể làm giảm độc đối với người. Trường hợp này Pasteur đã sử dụng để tạo vaccin dại bằng cách di chuyển virus dại nhiều lần qua thỏ làm cho virus giảm độc đối với người.

Sản xuất độc tố

Một số vi khuẩn có thể gây bệnh không phải bằng sự xâm lấn mà do sản xuất độc tố. Ví dụ như vi khuẩn uốn ván, vi khuẩn bạch hầu,... Độc tố chia làm hai loại dựa vào tính chất hóa học của nó.

Độc tố protein

- Ngoại độc tố (exotoxin)

Ngoại độc tố được sản xuất trong tế bào chất và được phóng thích ra ngoài môi trường.

Ví dụ như ngoại độc tố của vi khuẩn uốn ván *Clostridium tetani*, vi khuẩn bạch hầu *Corynebacterium diphtheriae*, độc tố của *Clostridium perfringens* và *Staphylococcus aureus* gây ngộ độc thức ăn.

- Độc tính: Rất độc. Ngoại độc tố của vi khuẩn bạch hầu, uốn ván có nồng độ tối thiểu gây chết là 1/1.000 đến 1/10.000.000.
- Tác động: Ngoại độc tố bạch hầu gây tê liệt, ngoại độc tố của uốn ván hướng thần kinh gây co cơ, gây hoại tử mô.
- Tính kháng nguyên: Kích thích sự thành lập kháng thể và kết hợp chuyên biệt với kháng thể.

Nếu tiêm ngoại độc tố vào cơ thể, cơ thể sẽ thành lập kháng thể kháng độc tố (*antitoxin*), trung hòa độc tố và làm mất độc tính. Huyết thanh chứa antitoxin được sử dụng làm huyết thanh trị liệu.

Giải độc tố (*anatoxin*): Ngoại độc tố của vi khuẩn uốn ván, yết hầu rất độc và có bản chất là protein nên dễ biến tính dưới tác động của nhiệt độ, formoi nhưng vẫn còn giữ được tính kháng nguyên nên được dùng làm vaccin chủng ngừa.

- Nội độc tố protein (endotoxin)

Độc tố này có ở vi khuẩn lỵ *Shigella dysenteriae*, vi khuẩn dịch hạch, ho gà. Độc tố không phóng thích ra ngoài vì gắn vào tế bào vi khuẩn và chỉ phóng thích khi vi khuẩn bị tiêu giải.

Độc tố là lipopolysacharid (LPS)

LPS là nội độc tố của phần lớn vi khuẩn Gram âm của họ Enterobacteriae như chi Salmonella, Escherichia, Shigella. Chúng nằm ở màng ngoài tế bào vi khuẩn và còn gọi là kháng nguyên O. Nó chỉ được phóng thích ra ngoài môi trường khi vi khuẩn bị tiêu giải.

Cấu tạo bởi *lipopolysacharid* có tính kháng nguyên chuyên biệt nhưng yếu, kháng thể được thành lập không trung hòa được nội độc tố LPS do không có antitoxin nên không tạo được huyết thanh trị liệu.

Nội độc tố LPS bền với nhiệt, alcol, không tạo được vô độc tố.

Bảng 6.1. So sánh tính chất của độc tố protein và độc tố lipopolysacharid

Độc tố	Protein	Lipopolysacharid
Vi khuẩn	Gram dương: exotoxin	
	Gram âm: endotoxin	Gram âm: endotoxin
Tác động của nhiệt độ	+	- -
Tính kháng nguyên	+++	+
Tạo vô độc tố	+	–
Triệu chứng lâm sàng	Chuyên biệt	Không chuyên biệt

Điều kiện thuận lợi cho sự nhiễm trùng

Ái lực của vi khuẩn đối với mô

Vi khuẩn chỉ xâm nhập và tăng trưởng tốt trong mô mà chúng có ái lực.

Ví dụ: *Salmonella typhi* có ái lực với mô bạch huyết ở thành ruột. Virus chó dại có ái lực với mô thần kinh.

Đường xâm nhập

Vi khuẩn phải xâm nhập đúng đường mới gây được bệnh nhiễm

Ví dụ: Đường tiêu hóa thuận lợi cho vi khuẩn gây bệnh ở ruột như thương hàn, tả, lỵ ... Chúng chịu được tác động của lysozym ở nước bọt và tính acid của dịch vị để đi đến mô có ái lực. Lậu cầu có ái lực với đường sinh dục. *Staphylococcus aureus* có ái lực với vết thương hay phỏng.

Nếu xâm nhập sai đường vi khuẩn sẽ không gây được bệnh nhiễm. Vi khuẩn uốn ván vào đường tiêu hóa thì vô hại, vào vết thương sẽ gây nguy hại.

2.3. Yếu tố vật chủ

Trường hợp người bình thường

Người bình thường là người khỏe mạnh trưởng thành, được nuôi dưỡng tốt, có khả năng kháng lại tất cả vi khuẩn cơ hội do phòng vệ tự nhiên và chỉ nhạy cảm (mắc bệnh) với vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt.

Như vậy, đối với vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt, cơ địa ít quan trọng.

Tuổi tác có làm giảm sự phòng vệ tự nhiên. Trẻ em và trẻ sơ sinh chưa có hệ thống phòng vệ hoàn chỉnh nên tăng tính nhạy cảm đối với vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt.

Yếu tố di truyền

Tuy chưa phổ biến nhưng rất quan trọng, chia làm hai nhóm: loại đáp ứng thấp và loại đáp ứng cao.

Một số người mắc bệnh xơ vữa động mạch do không có chất nhận cholesterol: do yếu tố di truyền không có gen tạo chất nhận đó.

Trạng thái sinh sống

- Chế độ ăn uống: Suy dinh dưỡng, thiếu các vitamin như A, D, C, nghiện rượu làm tăng tính nhạy cảm với vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt.
- Nhiệt độ: Lạnh làm giảm sự đề kháng tự nhiên. Ví dụ, ở 25°C những người tiếp xúc với *Bacillus anthracis* dễ bị bệnh than.
- Yếu tố xã hội: Trạng thái tạp cư, sống chung lộn xộn, mất vệ sinh sẽ hỗ trợ cho sự nhiễm bệnh, hơn nữa khi có dịch bệnh vi khuẩn dễ lan tràn và trở nên rất độc.
- Nghề nghiệp: Nhân viên y tế, nhân viên các lò sát sinh dễ bị nhiễm bệnh. Công nhân mỏ than hít nhiều bụi nên mắc bệnh silicon, từ đó dễ mắc bệnh lao.

Yếu tố miễn dịch tự nhiên

Một số người bình thường có khả năng đề kháng tự nhiên với một số vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt.

Nhiều bệnh không có ở người mà có ở thú, ngược lại nhiều bệnh không có ở thú mà chỉ có ở người như bệnh lao, bệnh lậu, bệnh phong.

Trường hợp người không bình thường

Người thiếu hoặc giảm một hay nhiều cơ chế đề kháng bình thường như thiếu hay suy giảm hệ thống miễn dịch.

Tính nhạy cảm

Ngoài các yếu tố ảnh hưởng như ở người bình thường, người không bình thường còn bị ảnh hưởng bởi tính nhạy cảm.

- Tính nhạy cảm tăng với vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt những người này phải được cách ly với nơi có bệnh chuyên biệt.
- Nhạy cảm với vi khuẩn cơ hội
  + *Loại vi khuẩn cơ hội:* Có thể là vi khuẩn nội sinh hay ngoại sinh (ở đất, nước, không khí ...) chúng chỉ gây bệnh khi cơ thể suy yếu
  + *Có cửa xâm nhập:* Hay sự phòng vệ mặt ngoài giảm do chấn thương ở da, niêm mạc, vết thương. Vi khuẩn có thể xâm nhập theo những ống dẫn lưu hay ống thăm dò. Những bệnh do nguyên nhân này gọi là bệnh do thầy thuốc.
  + *Khi phòng vệ bên trong suy yếu:*
    . Suy yếu tự nhiên do di truyền như trong bệnh giảm γ-globulin.
    . Suy yếu thu nhận: bệnh AIDS.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Để gây bệnh nhiễm chuyên biệt, điều quan trọng nhất là:
   - a. Phải có nhiều vi khuẩn độc
   - b. Vi khuẩn phải xâm nhập đúng đường
   - c. Vi khuẩn phải sinh sản được trong mô vật chủ
   - d. Vi khuẩn phải gắn được vào tế bào vật chủ
2. Bệnh nhiễm do vi khuẩn cơ hội phụ thuộc nhiều nhất vào:
   - a. Thể trạng bệnh nhân
   - b. Thời gian tiếp xúc vi khuẩn.
   - c. Chế độ dinh dưỡng
   - d. Có cửa ngõ để vi khuẩn xâm nhập.
   - e. a và d
3. Hệ vi khuẩn bình thường ở cổ họng là:
   - a. Vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt
   - b. Vi khuẩn gây bệnh cơ hội
   - c. Vi khuẩn ký sinh
   - d. Vi khuẩn có lợi
4. Enzym nào của vi khuẩn giúp chúng dễ dàng xâm lấn các cơ quan trong cơ thể:
   - a. Kinase
   - b. Amylase
   - c. Hyaluronidase
   - d. Collagenase
   - e. c, d đúng
5. Vi khuẩn hội sinh là:
   - a. Vi khuẩn và vật chủ đều không có lợi và không có hại
   - b. Vi khuẩn có thể gây hại cho tế bào chủ và ngược lại
   - c. Vi khuẩn ngoại sinh
   - d. Vi khuẩn có vai trò trong các chu kỳ nitơ, carbon

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. ***Vi sinh vật học***. 2001. NXB Giáo Dục.
2. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
3. G. J. Tortora, B. R. Funke, C.L Case. ***Microbiology – An Introduction***. 6th edition. 1992, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bài 7

KHÁNG NGUYÊN - KHÁNG THỂ

MỤC TIÊU

1. *Phân biệt được kháng nguyên và immunogen.*
2. *Định nghĩa được khu kháng nguyên và vai trò của chúng.*
3. *Nêu được cấu trúc của kháng thể và những vị trí của kháng thể.*
4. *Phân loại được các kháng thể.*

Trạng thái miễn dịch đã được biết đến từ lâu. Ví dụ: người mắc bệnh đậu mùa hay sởi sẽ không bị mắc bệnh lần thứ hai.

Động vật có xương sống có thể phân biệt cấu tử của mình và không phải của mình và tìm cách loại trừ chất lạ đó ra khỏi cơ thể.

Miễn dịch học là khoa học nghiên cứu những diễn biến của cơ thể nhìn nhận chất lạ gọi là kháng nguyên và những hậu quả của sự nhìn nhận này gọi là đáp ứng miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch là để bảo vệ cơ thể thông qua hai cách: miễn dịch thể dịch (thành lập kháng thể) và miễn dịch tế bào.

Đáp ứng miễn dịch ở một số người đối với một vài chất lạ có thể gây phản ứng quá mức tạo những triệu chứng tai hại. Đó là sự quá mẫn, nhưng quá mẫn có tính chất cá nhân trong khi miễn dịch có tính chất tổng quát.

1. KHÁNG NGUYÊN

1.1. Một số định nghĩa

Kháng nguyên (*antigen*)

Những chất thiên nhiên hay tổng hợp, được nhìn nhận bởi hệ thống miễn dịch của cơ thể (kết quả là tạo đáp ứng miễn dịch) nghĩa là được nhìn nhận bởi những tế bào lympho để tạo ra miễn dịch thể dịch và miễn dịch tế bào.

Immunogen là kháng nguyên dưới dạng có thể gây một đáp ứng miễn dịch chuyên biệt. Do đó từ này dùng để chỉ kháng nguyên về khía cạnh miễn dịch.

Allergen là kháng nguyên gây phản ứng mẫn cảm, còn gọi là dị ứng nguyên.

Kháng nguyên đẳng tính (*iso-antigen*). Người ta cũng tìm được một số loại kháng nguyên có ở nhiều loài. Ví dụ kháng nguyên Forsmann có ở ngựa, mèo, chồn... nhưng không có ở người, chuột, thỏ.

Tự kháng nguyên: Chỉ có ở cá thể đó

Khu kháng nguyên

Epitop

Phần chuyên biệt của kháng nguyên để tế bào lympho nhìn nhận và để phản ứng với kháng thể chỉ là một vùng giới hạn của kháng nguyên gọi là epitop – hay yếu tố quyết định tính kháng nguyên. Phần này ngắn và có cấu trúc không gian bổ sung với vị trí kháng thể. Ví dụ: đối với kháng nguyên là protein, epitop có kích thước rất nhỏ từ 5-7 acid amin. Khi thủy phân với enzym có thể cắt lấy được epitop, và epitop có thể gắn với kháng thể tương ứng với kháng nguyên toàn phần.

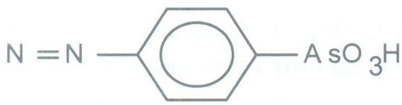
Vì kích thước epitop nhỏ nên không tạo được kháng thể, nhưng nếu gắn với một phân tử lớn như albumin thì tạo được kháng thể (gây được đáp ứng miễn dịch).

Hapten

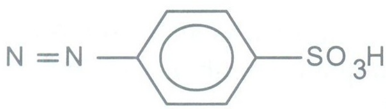
Thí nghiệm của Landsteiner

Landsteiner đã khám phá phần chuyên biệt của kháng nguyên gọi là hapten.

Dùng hai chất sau gắn vào globulin của thỏ:



Para Benzen Arseniat Diazonium (PBAD)



Para Benzen Sulfonat Diazonium (PBSD)

PBAD-Globulin thỏ Thỏ tạo kháng thể A.

Đổi nhóm arseniat bằng nhóm sulfonat:

PBSD-Globin thỏ Thỏ tạo kháng thể B.

- Nếu tiêm globulin của thỏ vào thỏ thì không tạo kháng thể.
- Nếu chỉ tiêm PBAD hoặc PBSD vào thỏ thì thỏ cũng không tạo được kháng thể.
- Nhưng nếu đem PBAD gắn vào một globulin khác của thỏ và tiêm vào thì tạo kháng thể A (hoặc kháng thể B nếu gắn globulin với PBSD).

Định nghĩa hapten

Các kết quả trên cho thấy phần chuyên biệt của kháng nguyên là PBAD hay PBSD được Landsteiner gọi là hapten.

Như vậy, *hapten* có nhiệm vụ như epitop, nhưng epitop là phần chuyên biệt của kháng nguyên thiên nhiên, còn hapten là những chất hóa học tổng hợp. Cả hai đều không kích thích tạo thành kháng thể nhưng khi phối hợp với một đại phân tử thì trở thành chất gây miễn dịch (immunogen).

Vậy có thể định nghĩa hapten là những chất hóa học có trọng lượng phân tử thấp và có cực, khi phối hợp với những đại phân tử sẽ có khả năng cảm ứng tạo kháng thể tương ứng.

1.2. Bản chất hóa học của kháng nguyên

Kháng nguyên protein

Nhóm này là nhóm lớn nhất của kháng nguyên thiên nhiên, ví dụ protein của sợi cơ. Vì cơ cấu phức tạp nên chỉ có một số ít được nghiên cứu sâu ở mức phân tử nghĩa là xác định được epitop.

Kháng nguyên polyosid

Đây là nhóm quan trọng thứ hai của kháng nguyên thiên nhiên. Gồm polyosid mạch thẳng và mạch nhánh. Nhiều kháng nguyên của vi sinh vật là glycoprotein mà phần chuyên biệt là phần glucid có ở màng tế bào nên gọi là kháng nguyên mặt ngoài.

Kháng nguyên lipid

Ít có kháng nguyên hoàn toàn là lipid. Phần lớn trường hợp chỉ khi lipid phối hợp với polyosid hay protein mới tạo được kháng nguyên. Có kháng nguyên chỉ là lipid như cardiolipin, là một phospholipid có ở trong mô tim của bò.

Kháng nguyên tổng hợp

Gồm những polypeptid và polysaccharid tổng hợp dùng để gắn với epitop và hapten để tạo chất gây miễn dịch.

1.3. Tính chất của kháng nguyên

Tính gây miễn dịch

Những tính chất sau đây cần thiết cho một kháng nguyên để gây miễn dịch.

Kích thước và cấu trúc không gian

Kháng nguyên phải có trọng lượng phân tử cao. Ví dụ nếu là protein phải có trọng lượng phân tử trên 5.000 dalton.

Kháng nguyên phải có cấu trúc không gian bền vững, không uyển chuyển để có thể gắn chuyên biệt vào thụ thể của tế bào lympho.

Điều kiện đưa kháng nguyên vào cơ thể

- Đường đưa vào: Thường dùng đường tiêm để đưa kháng nguyên vào.
- Lượng kháng nguyên: Phải tiêm một lượng đủ thì mới gây miễn dịch.

– Tá dược: Cường độ miễn dịch được gia tăng nếu tiêm kháng nguyên cùng với tá dược. Tá dược đã được sử dụng từ lâu để làm vaccin.

Hiện nay người ta dùng tá dược Freund, là một hỗn hợp dầu vô cơ (parafin), chất nhũ hóa và vi khuẩn lao bị giết chết. Nếu không có vi khuẩn lao thì gọi là tá dược Freund không hoàn toàn. Tá dược Freund chỉ dùng cho thú vì gây đau và gây phản ứng phụ ở người. Tá dược làm gia tăng sự đánh bắt kháng nguyên bởi đại thực bào do khuếch tán chậm, gây phóng thích kháng nguyên từ từ, vì dầu sẽ khó chuyển hóa nên nằm một chỗ, nhất là tạo được phản ứng viêm tại chỗ.

Tính chất lạ

Cơ thể không tạo miễn dịch chống lại protein của mình (nhìn được cái của mình và không của mình) nên chỉ đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên lạ.

Tính chuyên biệt

Phản ứng của kháng nguyên với kháng thể và tế bào lympho miễn dịch có tính chuyên biệt. Tính chuyên biệt này được quyết định bởi epitop và hapten.

Phản ứng miễn dịch đối với kháng nguyên còn tùy thuộc loài và cá thể cùng loài. Ngoài ra còn có nhiều bệnh không có vaccin chủng ngừa như lậu, vì cơ thể không sản xuất kháng thể chống lại kháng nguyên này hay không tạo được tế bào lympho chống lại.

1.4. Các loại kháng nguyên thông thường

Kháng nguyên của tế bào người

Kháng nguyên của hồng cầu (kháng nguyên nhóm máu)

Nhóm ABO

Hồng cầu có hai kháng nguyên chính là A và B bản chất là glycolipid. Kháng nguyên này chứa nhiều ở hồng cầu, một hồng cầu có khoảng 300.000 kháng nguyên và cũng có ở các cơ quan khác nhưng ít như da, thận.

Nhóm Rh (Rhesus)

Có một yếu tố trong hồng cầu của một số lớn người (85%) được ly trích bởi Landsteiner và Viner từ năm 1940, giống kháng nguyên của hồng cầu khỉ *Macacus Rhesus* nên được gọi là yếu tố *Rhesus* (viết tắt là Rh). Nếu máu một người chứa yếu tố này (Rh^+) được truyền cho một người không chứa yếu tố này (Rh^-) sẽ xảy ra sự ngưng kết chuyên biệt và sự ly giải. Nếu truyền tiếp bằng máu Rh^+ thì sẽ gây ngưng kết trầm trọng.

Trong trường hợp người cha Rh^+ và người mẹ Rh^-, trong lần sinh con thứ hai nếu bào thai có Rh^+ thì người mẹ tạo thành kháng thể anti Rh. Kháng thể này qua rau thai gây kết tủa và ly giải hồng cầu của bào thai. Đó là bệnh toạn nguyên hồng cầu mới sinh.

Nhóm kháng nguyên phù hợp mô chính (Major Histo-compatibility Complex-MHC)

Khái niệm phù hợp mô có nguồn gốc từ sự ghép bướu của một con chuột nhắt này sang một con chuột nhắt khác dòng. Mô ghép bị sa thải do phản ứng miễn dịch. Đó là hiện tượng không phù hợp mô (histo incompatibility). Nhưng nếu ghép bướu từ một dòng (chuột cho giao phối lẫn nhau 20 thế hệ) thì chuột nhận mô ghép mà không sa thải nghĩa là có sự phù hợp mô.

Những kháng nguyên có nhiệm vụ trong sự phù hợp mô là do một số gen liên kết tổng hợp nên gọi là phức hợp phù hợp mô chính. Ở chuột và người các kháng nguyên này là glycoprotein có ở mặt ngoài tế bào lympho B, lympho T và đại thực bào.

Kháng nguyên của vi khuẩn

Phần tử khuếch tán ra ngoài gồm các ngoại độc tố, enzym ngoại bào

Phần tử của tế bào:

– Kháng nguyên của nang hay của vỏ: ví dụ nang của phế cầu khuẩn.

– Kháng nguyên của tiêm mao: ví dụ kháng nguyên H của *Salmonella typhi.*

– Kháng nguyên của màng tế bào: ví dụ acid teichoic hay polysaccharid ở tụ cầu khuẩn. Kháng nguyên O ở vi khuẩn Gram âm.

2. KHÁNG THỂ

2.1. Định nghĩa

Kháng thể là những glycoprotein gọi là ***immunoglobulin*** (trước đây còn gọi là ***γ-globulin***) có trong huyết tương, tương dịch, dịch tiết, sản xuất bởi lympho B và có năng lực phối hợp chuyên biệt với khu kháng nguyên đã kích thích sự thành lập chúng.

Do có rất nhiều loại kháng nguyên nên cũng có rất nhiều kháng thể tương ứng.

Người ta đã phân loại Ig (*immunoglobulin*) làm 5 nhóm lớn theo nồng độ giảm dần trong huyết thanh: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

2.2. Cấu tạo hóa học

Cấu tạo cơ bản

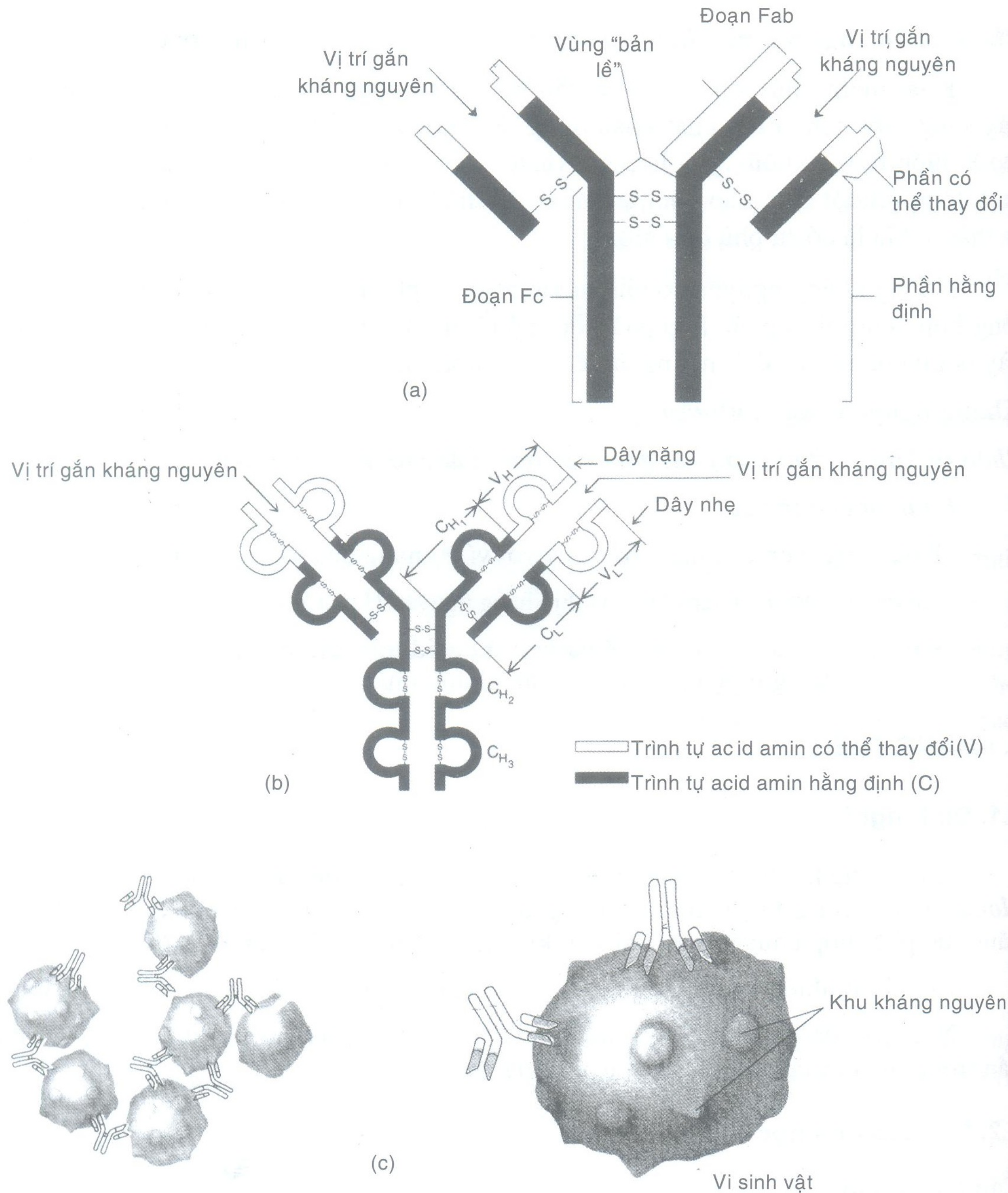
Tất cả Ig đều có cơ cấu cơ bản chung giống nhau, gồm 4 dây polypeptid trong đó có hai dây nặng (ký hiệu là H -heavy) có phân tử lượng trên 50.000 và hai dây nhẹ (ký hiệu là L -light) có phân tử lượng 23.000 dalton.

Bốn dây peptid tạo thành hai cặp kích thước không đều:

– Hai dây nặng nối với nhau bởi cầu nối disulfur.

– Dây nhẹ gắn vào dây nặng bởi một cầu nối disulfur, ở gần đầu có nhóm carbonyl.

– Dây nặng có tính chất chuyên biệt cho mỗi loại Ig.



Hình 7.1. Cấu trúc phân tử kháng thể

(a) Các thành phần của phân tử kháng thể. (b) Cấu tạo chi tiết.
(c) Phản ứng giữa phân tử kháng thể và khu kháng nguyên đặc hiệu.

Cấu tạo hóa học của hai dây

Cấu tạo dây nhẹ

Có 214 acid amin, được đánh dấu từ NH_2 đến COOH trong đó acid amin từ số 1 đến số 107 có sự thay đổi thứ tự acid amin giữa các Ig nên gọi là V_L (variable). Từ acid amin 108 đến 214 trình tự acid amin không thay đổi giữa các Ig nên gọi là C_L.

Trong phần V_L, phân tích chi tiết thấy có 3 phần có sự thay đổi thứ tự acid amin rất cao giữa các Ig, mỗi phần có 5-10 acid amin, gọi là phần thay đổi nhiều. Ba phần này cách nhau bởi những phần dài ít thay đổi.

Cấu tạo dây nặng

Có 446 acid amin có thể chia làm hai phần không đều nhau dựa vào mức độ thay đổi thứ tự acid amin.

3/4 dây nặng kể từ nhóm COOH là phần không đổi: không có sự thay đổi các acid amin giữa các Ig, gọi là C_H, phần này có 3 phần nhỏ là: C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}.

1/4 dây nặng còn lại là phần có sự thay đổi thứ tự các acid amin giữa các Ig (V_H) và cũng có 3 phần thay đổi cao tương ứng 3 phần thay đổi nhiều của dây nhẹ. Chính phần thay đổi cao này là phần chuyên biệt của Ig.

Ngoài ra, Ig còn chứa 3% glucid.

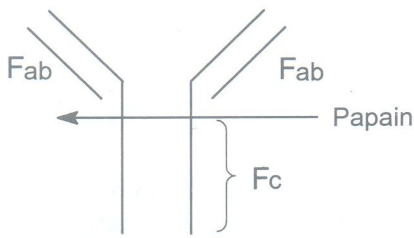
2.3.Cấu tạo sinh học

Tác động của enzym trên Ig

Dùng enzym cắt Ig để thấy rõ phần nào của Ig có tác động sinh học.

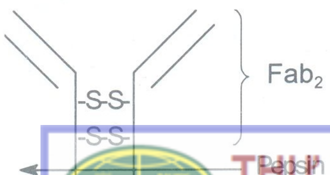
Tác động của papain

Dưới tác động của papain, Ig được tách làm 3 phần bằng nhau: một phần dây nặng là Fc và hai phần Fab gồm dây nhẹ và một phần dây nặng.



Tác động của pepsin

Pepsin cắt phía sau cầu disulfur cho ra Fab_2 và oligopeptid không có tác động sinh học, $Fab_2 > 2$ Fab



Nhiệm vụ của mỗi phần

Nhiệm vụ của Fab và Fab_2

Chứa vị trí kết hợp kháng nguyên của kháng thể (trong vùng thay đổi nhiều). Hai dây nhẹ và nặng đều tham dự vào sự thành lập vị trí kết hợp kháng nguyên của kháng thể.

Tác động của enzym nhất là papain cho thấy Fab và Fc có nhiệm vụ khác nhau.

Nhiệm vụ của Fc

Fab có nhiệm vụ gắn kháng nguyên còn Fc có bốn nhiệm vụ sau:

Sự thoái hóa Ig

Fc có nhiệm vụ điều hòa sự thoái hóa của Ig. IgG có thời gian bán hủy là 3 tuần, còn các Ig khác dưới một tuần. Điều này cần lưu ý khi sử dụng γ-globulin trong bệnh thiếu γ-globulin.

Giúp Ig đi qua rau thai

IgG đi qua rau thai được do có chất nhận ở Fc. IgD có phân tử lượng xấp xỉ IgG nhưng không đi qua được.

Gắn với bạch cầu đa nhân ưa kiềm

Các bạch cầu đa nhân ưa kiềm gắn dễ dàng vào Fc của IgE. IgE là kháng thể tương ứng với dị ứng nguyên (kháng nguyên gây phản ứng quá mẫn). Sau khi IgE gắn với dị ứng nguyên và gắn với bạch cầu ưa kiềm thì bạch cầu này sẽ tiết ra histamin và serotonin gây phản ứng quá mẫn kiểu tức thời.

Gắn với bổ thể

Một số kháng thể chỉ phản ứng được với kháng nguyên khi có sự hỗ trợ của một loại protein gọi là bổ thể.

2.4. Những nhóm Ig chính

IgG

Kích thước 7S, chứa 3% carbohydrat. Có nhiều nhất trong huyết tương (75%). Các kháng thể thuộc nhóm IgG: kháng thể tuần hoàn, kháng thể opsonin, kháng thể gắn bổ thể, kháng thể trung hòa độc tố.

IgM

Kích thước 15S. Có nồng độ 0,5-1,9 g/lít, chứa 12% carbohydrat, cấu tạo bởi 5 phần tử giống nhau (10 dây nhẹ, 10 dây nặng) tạo thành ngôi sao 5 cánh.

Trong bệnh macroglobulin (trong máu có nhiều globulin lớn) IgM tạo thành nhiều cao phân tử gây độ nhớt cao trong máu nên phải rút huyết thanh ra và thay bằng huyết thanh khác.

IgM là kháng thể đầu tiên được tạo thành sau khi cơ thể tiếp xúc kháng nguyên (giai đoạn một của đáp ứng miễn dịch). Nhưng sau đó chúng thoái hoá nhanh và IgG được thành lập có nồng độ cao và có đời sống dài hơn (giai đoạn hai của đáp ứng miễn dịch). Hiện tượng này được dùng trong chẩn đoán. IgM gia tăng nghĩa là chỉ bệnh mới nhiễm, nếu IgM bình thường, IgG tăng thì bệnh nhiễm đã lâu.

Áp dụng trong chẩn đoán ở trường hợp người mang thai mắc bệnh Rubêôn: thời gian 3 tháng đầu mang thai cần biết bệnh đã nhiễm lâu hay mới nhiễm vì liên quan đến dị tật của bào thai, nếu nhiễm trong tháng đầu có 85% con bị dị tật, nhiễm trong tháng thứ 3 chỉ còn 15% con dị tật.

IgM thật sự không biến đổi là kháng thể anti A, anti B của kháng nguyên ABO cũng là kháng thể chống lại kháng nguyên không tùy thuộc tuyến ức.

IgA

Có 1,4 – 4 g/L, chứa 80% carbohydrat. Có hai loại IgA:

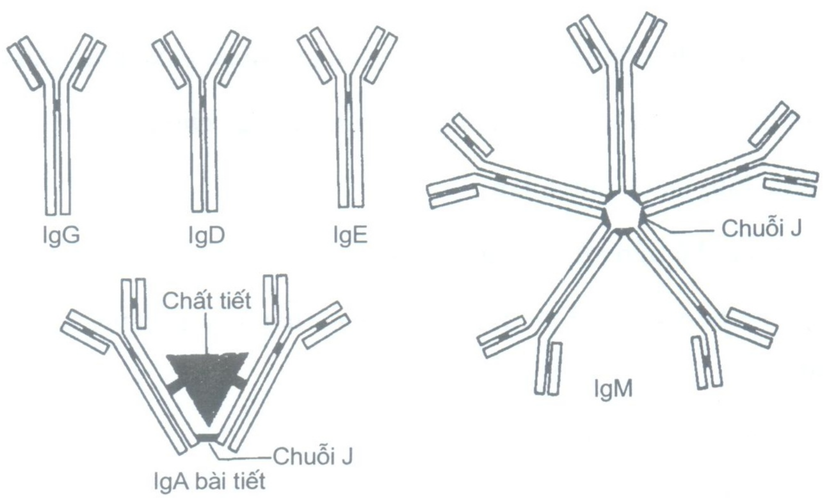
- *IgA huyết tương*: Kích thước 7S, là những glycoprotein. Hai dây nặng và dây nhẹ IgA có trong huyết tương ở bệnh u tủy.
- *IgA tiết*: Có trong chất tiết như nước bọt, nước mắt, mũi, nước cuống phổi. IgA tiết có ở mặt ngoài ống tiêu hóa hay cuống phổi có tính kháng khuẩn do ngăn chặn vi khuẩn bám vào niêm mạc.

IgD

Kích thước 6,5 S, có 30mg/lit, chứa 12% carbohydrat, có nồng độ thấp trong huyết tương. Thời gian bán hủy 2-5 ngày. Nhiệm vụ sinh lý ít, rất ít kháng thể thuộc nhóm IgD.

IgE

Kích thước 8S, chứa 11% carbohydrat, có nồng độ rất thấp trong huyết tương: 100-200mg/lít. Thời gian bán hủy 2-5 ngày. IgE có nhiệm vụ trong phản ứng quá mẫn.



Hình 7.2. Cấu trúc của 5 loại kháng thể

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Kháng nguyên muốn gây được đáp ứng miễn dịch cần

a. Đưa vào bằng đường chích

b. Có tính chất lạ

c. Kèm với tá dược

d. Có tính kháng nguyên

2. Phản ứng miễn dịch thể dịch là phản ứng bảo vệ cơ thể với sự tham gia của

a. Kháng nguyên và kháng thể

b. Kháng nguyên và tế bào miễn dịch

c. Đại bạch bào và kháng thể

d. Tất cả đều đúng

3. Khu kháng nguyên là

a. Một phần nhỏ của phân tử kháng nguyên gắn với kháng thể một cách chuyên biệt

b. Phần xác định phản ứng miễn dịch

c. Một phần nhỏ của phân tử kháng nguyên kích thích sự thành lập kháng thể

d. Phần protein có tính miễn dịch

4. Antitoxin là

a. Huyết thanh chứa kháng thể chuyên biệt liên kết với toxin và làm mất hoạt tính của chúng

b. Một hợp chất hóa học chống lại sự tiết toxin

c. Một loại kháng thể chuyên biệt liên kết với toxin và làm mất hoạt tính của chúng

d. Protein liên kết với toxin và làm mất hoạt tính của chúng

5. Miễn dịch chủ động được thành lập

a. Ngay khi cơ thể tiếp xúc với tác nhân gây bệnh

b. Khi cơ thể tiếp xúc với tác nhân gây bệnh hay chủng ngừa bằng vaccin sau 1 thời gian

c. Trong tất cả các bệnh nhiễm

d. Tất cả đều đúng

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. ***Vi sinh vật học***. 2001. NXB Giáo Dục.
2. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
3. G. J. Tortora, B. R. Funke, C.L Case. ***Microbiology – An Introduction***. 6th edition, 1992, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bài 8

PHẢN ỨNG HUYẾT THANH

MỤC TIÊU

1. *Nêu được ý nghĩa của các phản ứng huyết thanh học.*
2. *Phân biệt được đặc điểm của các phản ứng huyết thanh học.*
3. *Nắm được nguyên tắc và ứng dụng của các phản ứng huyết thanh học.*

1. ĐẠI CƯƠNG

Phản ứng kháng nguyên-kháng thể còn được gọi là phản ứng huyết thanh vì thông thường huyết thanh chứa kháng thể của bệnh nhân.

Từ cuối thế kỷ XVIII, phản ứng huyết thanh lần đầu tiên đã được dùng trong phòng thí nghiệm để chẩn đoán bệnh nhiễm.

Do tính chuyên biệt và nhạy cảm cao, phản ứng kháng nguyên-kháng thể ngày nay được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán lâm sàng:

- Tìm kháng thể trong huyết thanh.
- Nhận định vi sinh vật gây bệnh.
- Đo sự gia tăng kháng thể trong máu để nhận định có bệnh nhiễm.

2. ĐẶC ĐIỂM CỦA PHẢN ỨNG HUYẾT THANH

Phản ứng huyết thanh xảy ra giữa kháng nguyên và kháng thể chuyên biệt. Trong một số trường hợp có thể nhận định một phản ứng huyết thanh một cách đơn giản là đặt các chất phản ứng lên lam kính và quan sát phản ứng. Tuy nhiên, phản ứng huyết thanh không hoàn toàn trực tiếp, sự liên kết kháng nguyên-kháng thể chỉ là sự liên kết 1:1, có thể không quan sát được, nên cần một giai đoạn thứ hai với hệ thống chỉ thị. Nhờ đó có thể quan sát được phản ứng.

Một hạn chế khác của phản ứng huyết thanh học là kháng nguyên hay kháng thể cần phải pha loãng nhiều lần để có một nồng độ thích hợp nhất cho phản ứng. Vì vậy cần phải xác định nồng độ thích hợp nhất của kháng thể để phản ứng với một kháng nguyên chuyên biệt được tốt nhất. Đó là tỷ lệ kháng thể trong dung dịch.

Hapten cũng là một yếu tố quan trọng trong phản ứng huyết thanh học bởi vì nó là một phần của kháng nguyên. Chúng chỉ có một vị trí xác định kháng nguyên. Người ta cho hapten liên kết với một chất mang như polystyren. Khi đó nếu hapten liên kết với kháng thể có thể quan sát được phản ứng.

3. CÁC LOẠI PHẢN ỨNG HUYẾT THANH

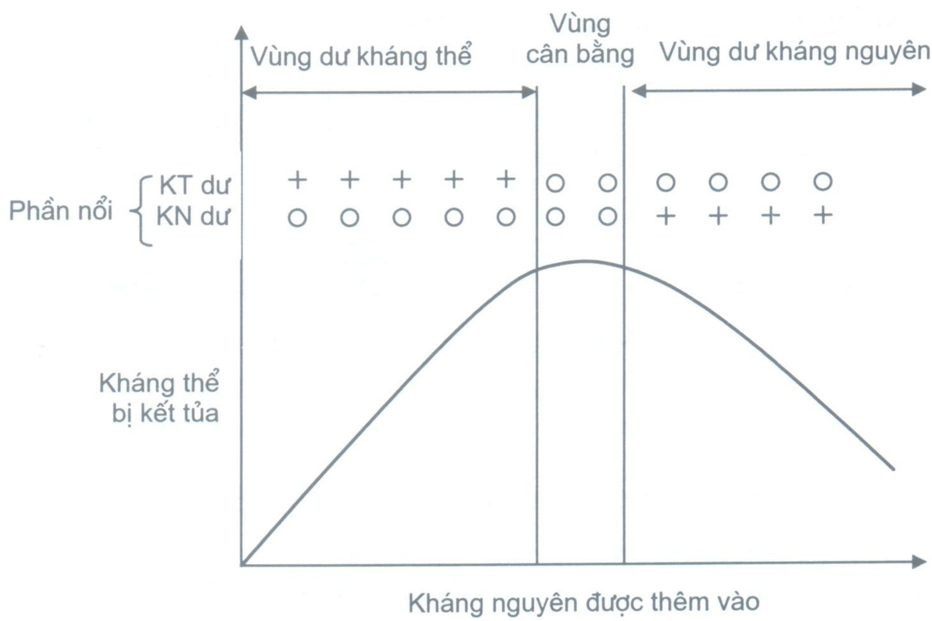
3.1. Phản ứng trung hòa

Phản ứng trung hoà là phản ứng huyết thanh trong đó diễn ra sự trung hòa giữa kháng nguyên và kháng thể. Phản ứng này thường dùng để nhận định độc tố và kháng độc tố, virus và kháng thể chống virus.

Bình thường, một lượng nhỏ kháng thể không thể nhận biết được phản ứng trung hòa, cần phải tiêm nó vào thú vật thử nghiệm để xác định.

Ví dụ: Xác định độc tố botulin trong thực phẩm. Độc tố này làm chết thú thử nghiệm, nhưng nếu thực phẩm được trộn với antitoxin của độc tố này, độc tố sẽ không còn tác dụng trên thú. Ngược lại, nếu độc tố được sản xuất bởi những loại vi sinh vật khác thì sẽ không có sự trung hòa và thú vẫn chết.

3.2. Phản ứng kết tủa



Hình 8.1. Đường cong kết tủa của một kháng nguyên với một kháng thể chuyên biệt

Phản ứng kết tủa là một phản ứng huyết thanh trong đó có hàng ngàn phân tử kháng nguyên-kháng thể liên kết với nhau ở những vị trí xác định, tạo thành một dạng mạng lưới. Những mạng lưới này tạo thành những phần kết tủa lớn và sản phẩm phản ứng có thể quan sát được bằng mắt thường.

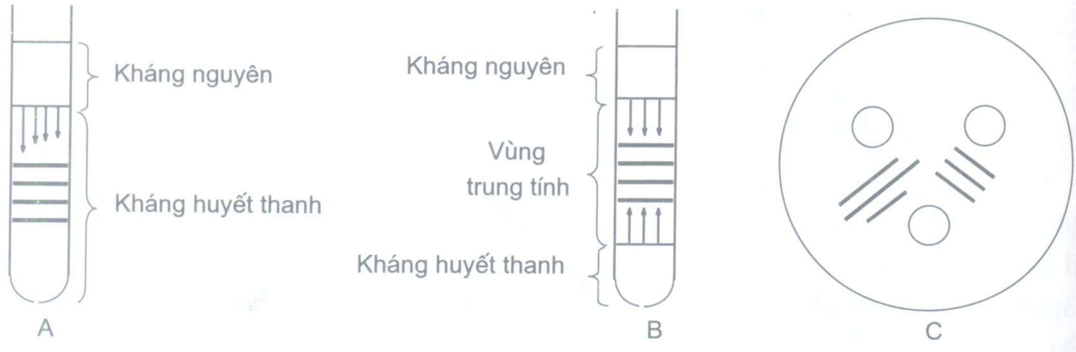
Phản ứng kết tủa có thể tiến hành trong môi trường lỏng hoặc trong gel.

Phản ứng kết tủa trong môi trường lỏng

Kháng nguyên và kháng thể ở dạng hòa tan được chia trong những ống nghiệm. Phản ứng kháng nguyên-kháng thể sẽ cho kết tủa nhiều nhất ở vùng cân bằng. Có thể quan sát được bằng cách cho vào một loạt ống nghiệm đã chứa một lượng kháng thể nhất định mỗi ống một lượng kháng nguyên với nồng độ từ thấp đến cao.

Phản ứng kết tủa trong gel

Kháng nguyên và kháng thể có thể khuếch tán trong gel với tốc độ khác nhau tùy thuộc bản chất. Thường dùng gel bán lỏng (agarose). Kỹ thuật này được Jacques Oudin mô tả lần đầu tiên năm 1946. Trong những ống nghiệm phản ứng, người ta để dung dịch kháng nguyên ngăn cách với dung dịch kháng thể bởi một lớp gel (hình 8.2.A). Những phân tử kháng nguyên và kháng thể sẽ khuếch tán và tiếp xúc với nhau tạo những vòng kết tủa có thể thấy được. Kỹ thuật này gọi là khuếch tán hai lần và một chiều vì cả kháng nguyên lẫn kháng thể đều khuếch tán.



Hình 8.2. Cách bố trí phản ứng kết tủa trong gel

A. Khuếch tán đơn theo một chiều.

B. Khuếch tán hai lần theo hai chiều.

C. Khuếch tán hai lần theo hai chiều. Những mũi tên chỉ hướng khuếch tán, những vạch đen chỉ các dải kết tủa đục.

Một kỹ thuật khác gọi là khuếch tán hai lần và hai chiều đã được Orjan Ouchterlony áp dụng năm 1948. Trong kỹ thuật này, kháng nguyên và kháng thể được để trong những lỗ đục của bản thạch agarose. Kháng nguyên và kháng thể sẽ kết tủa tạo thành những đường ở vùng cân bằng (hình 8.2.B, C). Kỹ thuật này được dùng để xác định các loại kháng nguyên và kháng thể chưa biết và khảo sát thành phần hóa học có trong nhiều loại kháng nguyên.

Kỹ thuật miễn dịch điện di

Một hỗn hợp kháng nguyên được đặt trong các giếng đục trên bản thạch tráng trên lam kính, được nối với một điện trường. Kháng nguyên trong hỗn hợp khuếch tán trong gel tùy theo điện tích phân tử của chúng. Hỗn hợp kháng thể được cho vào máng. Đem ủ máng phản ứng, kháng nguyên và kháng thể sẽ khuếch tán vào trong gel. Khi kháng nguyên gặp kháng thể tương ứng, cung kết tủa sẽ được tạo thành. Dựa vào việc đánh giá kiểu sắp xếp của các cung kết tủa và so sánh với các chuẩn đã biết có thể thu được các thông tin lâm sàng hay nghiên cứu. Có thể phối hợp kỹ thuật khuếch tán và kỹ thuật điện di để xác định kháng nguyên. Hỗn hợp kháng nguyên sẽ được chạy điện di trên bản thạch agarose sau đó cắt một đoạn agarose theo chiều dài bản thạch và cho vào đó dung dịch kháng thể đã biết rồi đem ủ, kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu sẽ khuếch tán tạo thành những đường kết tủa (hình 8.3).

3.3. Phản ứng ngưng kết

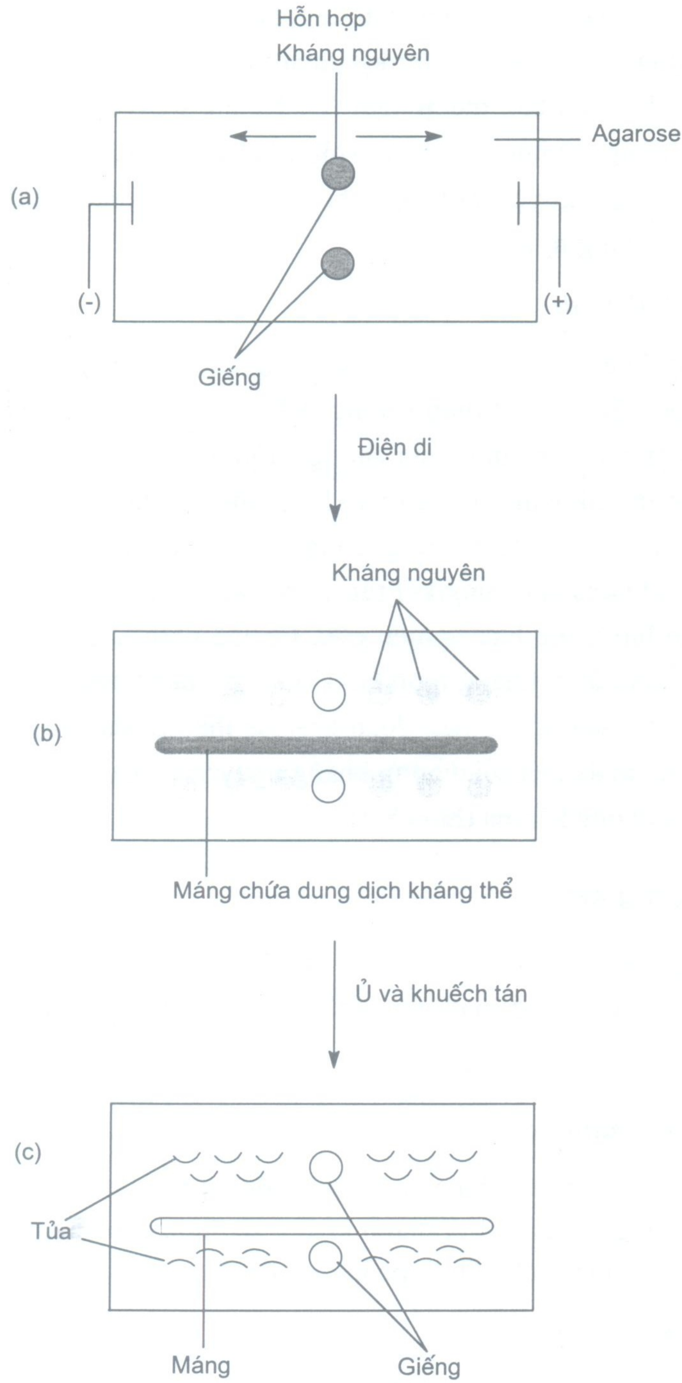
Phản ứng ngưng kết là một loại phản ứng huyết thanh, trong đó kháng thể phản ứng với kháng nguyên trên bề mặt của các phân tử và dẫn tới sự tụ tập chúng hay sự ngưng kết.

Phản ứng ngưng kết gián tiếp

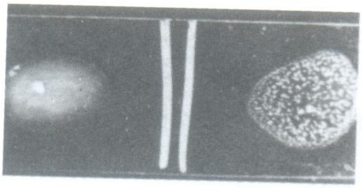
Kháng nguyên được hấp thu trên bề mặt những hạt latex, polystyren, hồng cầu, vi khuẩn hay vật mang khác. Huyết thanh kháng sẽ được cho vào những vật mang này. Phản ứng này cho kết quả ít nhạy hơn phản ứng kết tủa.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu

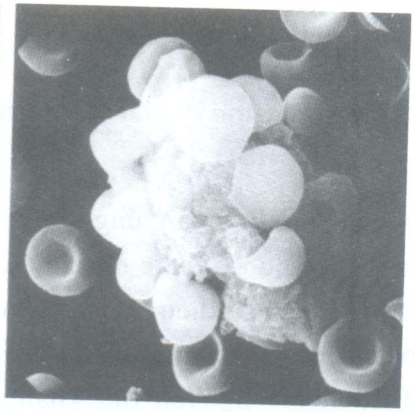
Phản ứng này quan trọng để nhận định nhóm máu. Ngoài ra, một vài loại virus có khả năng ngưng kết hồng cầu dùng để tìm kháng thể virus. Lấy huyết thanh bệnh nhân cho liên kết với virus nuôi trong phòng thí nghiệm, sau đó cho hồng cầu vào. Nếu huyết thanh có kháng thể, hồng cầu sẽ không bị ngưng kết. Đây là thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu.



Hình 8.3. Kỹ thuật miễn dịch điện di



(a)



(b)

Hình 8.4. Hình ảnh của phản ứng ngưng kết

Phản ứng trên lam kính. Tế bào Salmonella được trộn với kháng thể của Salmonella ở bên phải và trộn với dung dịch muối sinh lý không có kháng thể ở bên trái. Các cụm vi khuẩn nhìn thấy bằng mắt thường ở bên phải là bằng chứng có sự ngưng kết (a). Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử các hồng cầu người bị ngưng kết bởi các khóm nhỏ của *Mycoplasma pneumoniae*, nguyên nhân gây viêm phổi không điển hình (b).

3.4. Phản ứng kết bông

Phản ứng này có nguồn gốc từ sự kết tủa và ngưng kết kháng nguyên có trong những phần được tách ra từ tế bào, sẽ phản ứng với kháng thể tạo thành những tủa bông.

Ví dụ: Phản ứng VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) dùng để phát hiện một cách nhanh chóng vi khuẩn giang mai. Kháng nguyên của vi khuẩn là cardiolipin được chiết bằng cồn. Sau khi hòa tan trong dung dịch đệm, cardiolipin sẽ có dạng tủa trắng như sữa. Thêm huyết thanh của bệnh nhân vào. Nếu huyết thanh chứa kháng thể giang mai, phần tử kết tủa của kháng nguyên sẽ phản ứng với kháng thể và chúng sẽ kết dính vào nhau tạo kết tủa bông nhẹ nhàng. Quan sát dưới kính hiển vi, ghi nhận sự hiện diện của kháng thể. Phản ứng VDRL chỉ là phản ứng dò tìm ban đầu (có trường hợp dương tính giả).

3.5. Các phản ứng khác

Phản ứng cố định bổ thể

Bổ thể là một nhóm protein ký hiệu C_1, C_2, C_3, C_4 ... có trong cơ thể người và nhiều loài thú có nhiệm vụ trong bảo vệ cơ thể và trong phản ứng miễn dịch.

Bảo vệ cơ thể

Bổ thể có vai trò trong quá trình ly giải vi khuẩn. Kháng thể muốn ly giải được vi khuẩn phải có bổ thể.

Trong phản ứng miễn dịch: Phản ứng bổ thể được Jules Bordet và Octave Gengon phát hiện năm 1901. Sau đó được dùng để chẩn đoán bệnh giang mai. Ngày nay vẫn dùng để tìm kháng thể của nhiều loại virus, nấm và vi khuẩn. Ví dụ ứng dụng trong khảo sát chẩn đoán bệnh giang mai. Dùng kháng nguyên dưới dạng hapten của *Treponema palidum*. Biết kháng nguyên tìm kháng thể trong máu bệnh nhân. Tuy nhiên phản ứng kháng nguyên-kháng thể trong trường hợp này không thấy được bằng mắt thường nên cần một phản ứng thứ hai để phát hiện, đó là phản ứng ly giải hồng cầu. Quá trình này gồm hai phản ứng:

Phản ứng 1:

Kháng nguyên + Huyết thanh bệnh nhân đã loại bổ thể + Bổ thể (để ở 56°C trong 30 phút).

Có hai trường hợp:

- Huyết thanh có kháng thể nhưng không thấy được phản ứng.
- Huyết thanh người bệnh không có kháng thể.

Phản ứng 2: Phản ứng phát hiện bằng sự ly giải hồng cầu cừu.

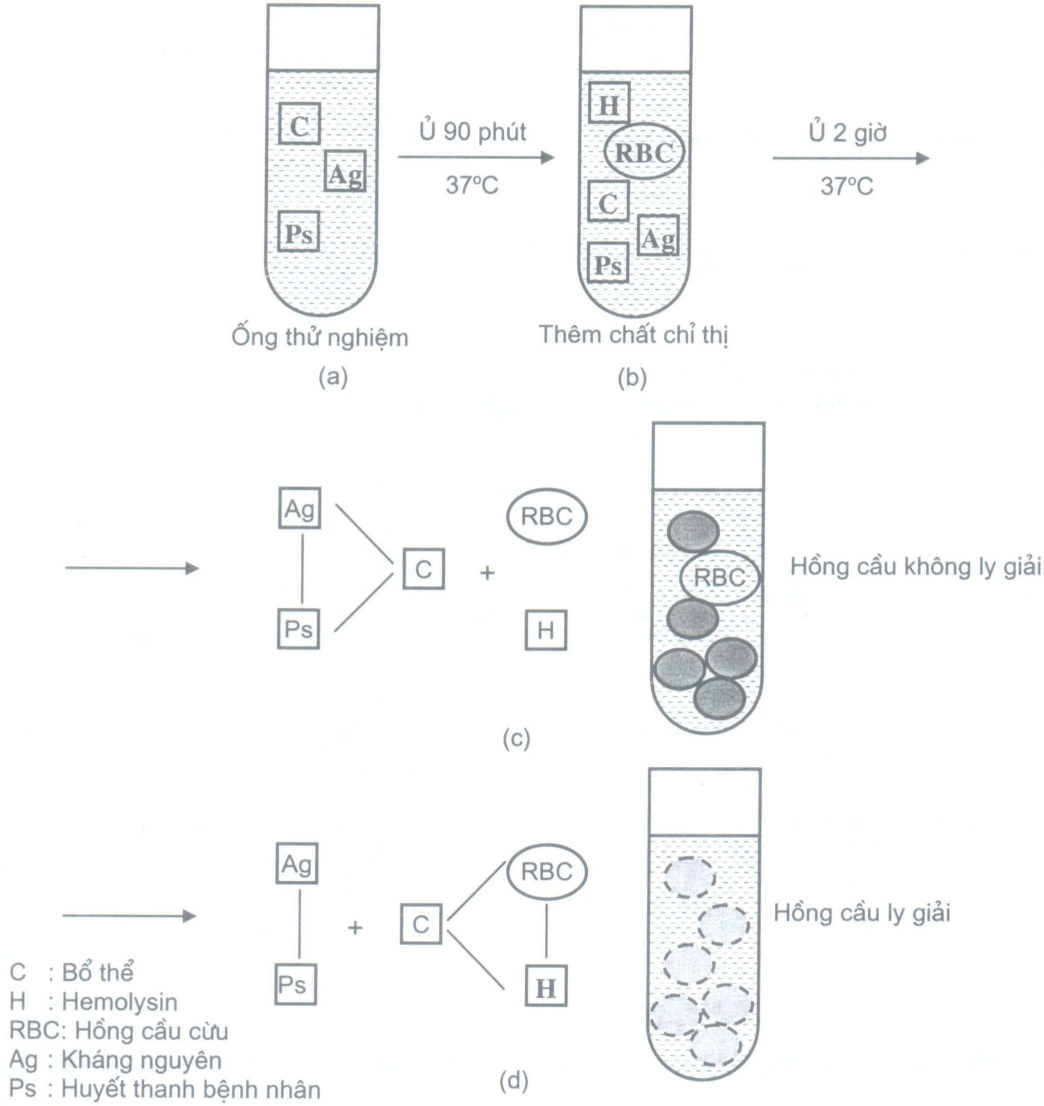
Hồng cầu cừu + Huyết thanh thỏ kháng hồng cầu cừu (đã loại bổ thể) Sẽ thấy có sự ly giải hồng cầu phóng thích màu đỏ.

Phối hợp hai phản ứng trên:

Hồng cầu cừu + Hemolysin + Kháng nguyên giang mai + Huyết thanh bệnh nhân + Bổ túc thể.

Có hai trường hợp:

- Huyết thanh bệnh nhân có kháng thể: bổ thể gắn với kháng thể của bệnh nhân, sẽ không còn bổ thể, do đó hồng cầu cừu không bị ly giải nên không có màu đỏ. Kết luận có mắc bệnh.
- Huyết thanh bệnh nhân không có kháng thể: Bổ thể còn tự do sẽ gắn với kháng thể của huyết thanh kháng hồng cầu cừu, do đó có sự ly giải hồng cầu cừu nên có màu đỏ. Kết luận không mắc bệnh.

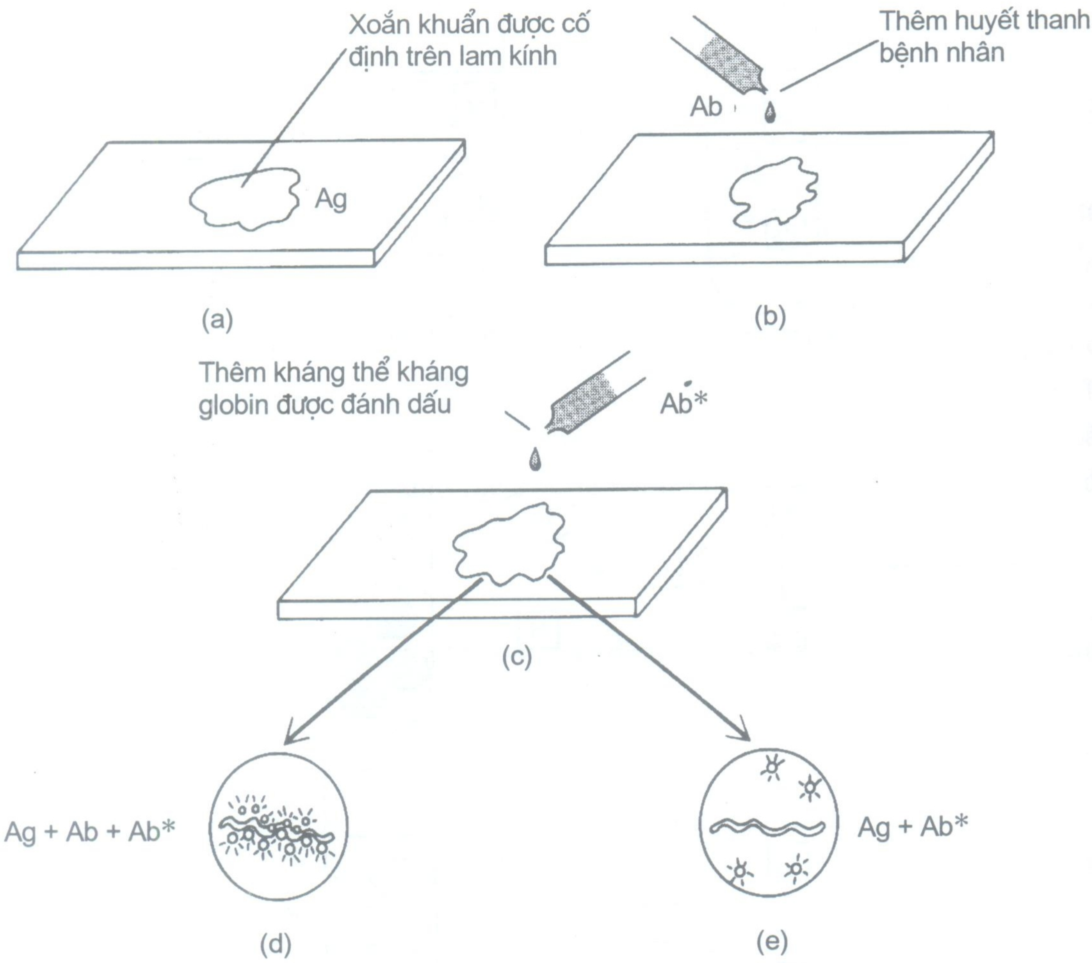


Hình 8.5. Phản ứng cố định bổ thể

Kỹ thuật kháng thể huỳnh quang

Phản ứng được thực hiện trên lam kính do sự kết hợp kháng nguyên và kháng thể và một chất phát quang. Khi phản ứng xảy ra sẽ có sự phát quang nếu soi dưới ánh sáng tử ngoại hay kính hiển vi huỳnh quang.

Phản ứng kháng thể huỳnh quang có thể trực tiếp hay gián tiếp.



Hình 8.6. Phản ứng FTA - Abs (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption)

Vi khuẩn giang mai được cố định lên lam kính (a), thêm huyết thanh của bệnh nhân (b), sau đó thêm vào kháng thể kháng globulin có đánh dấu, được sản xuất bằng cách tiêm kháng thể vào thú. Sau đó quan sát lam kính dưới kính hiển vi huỳnh quang (c). Nếu huyết thanh bệnh nhân chứa kháng thể kháng vi khuẩn giang mai, kháng thể sẽ gắn lên bề mặt vi khuẩn. Sau đó kháng thể kháng globulin sẽ kết hợp với những kháng thể này, vi khuẩn sẽ phát sáng (d). Nếu huyết thanh không có kháng thể sẽ không có sự tích tụ kháng thể trên bề mặt vi khuẩn và kháng thể kháng globulin sẽ không tích tụ trên bề mặt mà vẫn nằm trong dung dịch và vi khuẩn không phát sáng (e).

Phương pháp trực tiếp, chất nhuộm màu huỳnh quang được gắn với kháng thể đã biết, sau đó kháng thể sẽ kết hợp với kháng nguyên (Ví dụ: vi khuẩn có thể có chứa kháng nguyên). Nếu sự phỏng đoán là đúng, kháng thể đích sẽ tích tụ trên bề mặt những phần tử kháng nguyên và những phần tử này sẽ phát sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phương pháp gián tiếp được minh họa trong phản ứng FTA - Abs (fluorescent treponemal antibody absorption test) để chẩn đoán vi khuẩn giang mai (hình 8.6).

Kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi để tìm kháng nguyên. Có thể phát hiện vi khuẩn trên phiến kính, virus gắn trên vật mang.

Phương pháp định lượng bằng miễn dịch phóng xạ (RIA)

Phương pháp này có độ chính xác cao, được dùng để đo nồng độ các kháng nguyên có trọng lượng phân tử nhỏ như hapten. Ngoài ra còn thích hợp cho việc định lượng kháng nguyên trong bệnh viêm gan virus cũng như những sản phẩm hormon, insulin và một vài dược phẩm. Một trong những ưu điểm của phương pháp này là có thể xác định được một chất với nồng độ nanogram.

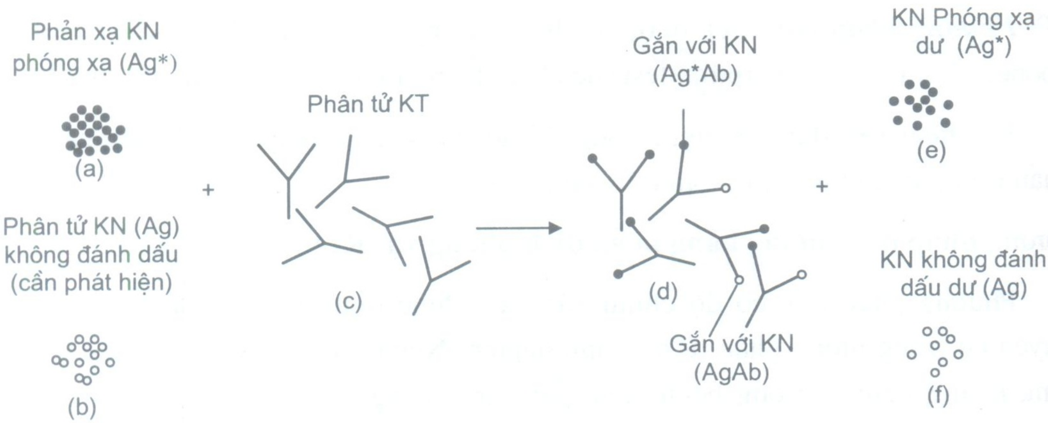
RIA được thực hiện dựa trên sự gắn các kháng nguyên đã được đánh dấu bằng chất phóng xạ và những kháng nguyên cần định lượng trên những vị trí của kháng thể. Đem trộn một lượng xác định kháng nguyên đánh dấu với một lượng kháng thể xác định và một lượng kháng nguyên chưa biết. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể được tạo thành sẽ được tách ra và đo tác động phóng xạ. Bằng cách đo tác động phóng xạ của kháng nguyên tự do còn lại sau phản ứng người ta có thể tính số phần trăm của kháng nguyên đánh dấu đã liên kết với kháng thể bằng tỷ lệ B/F. Tỷ lệ này sẽ tương đương tỷ lệ của kháng nguyên không đánh dấu liên kết với kháng thể, bởi vì cả hai kháng nguyên đánh dấu và không đánh dấu đều có khả năng tìm những vị trí trên kháng thể như nhau.

Nồng độ của kháng nguyên không đánh dấu chưa biết sau đó được suy ra trên một đường biểu diễn chuẩn. Đường biểu diễn được thành lập dựa trên cơ sở thay đổi những lượng kháng nguyên không đánh dấu gắn với kháng thể và xác định tỷ lệ phần trăm kháng nguyên liên kết/kháng nguyên tự do (tỷ lệ B/F của kháng nguyên cần định lượng bằng tỷ lệ B/F của kháng nguyên đánh dấu).

Phương pháp này chỉ dùng trong những phòng thí nghiệm chuyên biệt.

4. KỸ THUẬT MIỄN DỊCH MEN (ELISA)

Phương pháp này cũng có độ chính xác cao như phương pháp định lượng bằng miễn dịch phóng xạ nhưng không cần có những trang thiết bị đắt tiền.

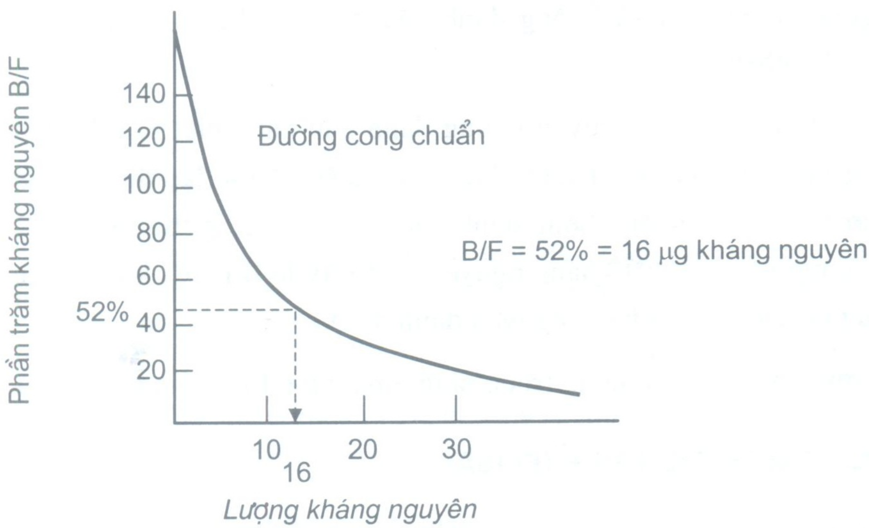


Kháng nguyên đánh dấu với lượng xác định (a) được trộn với kháng nguyên không đánh dấu cần định lượng (b). Cả hai được phối hợp với kháng thể đặc hiệu (c). Vì mỗi phân tử kháng thể có 2 vị trí phản ứng, nên một số sẽ gắn với kháng nguyên đánh dấu và một số gắn với kháng nguyên không đánh dấu (d). Số vị trí được gắn phụ thuộc nồng độ kháng thể, vẫn còn một lượng kháng nguyên mỗi loại thừa ra (e),(f).

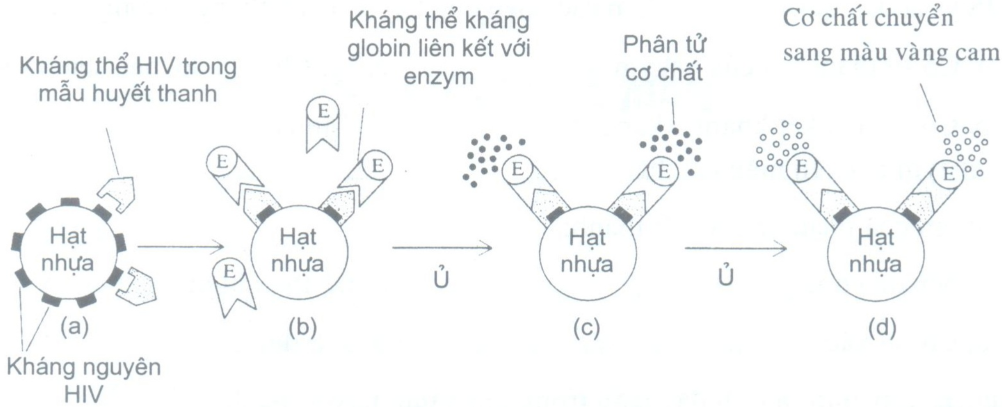
Sau khi đo tác động phóng xạ, tính tỷ lệ B /F bằng công thức:

$$\frac{B}{F}=\frac{\text{KN lk (Ag*Ab)}}{\text{KN td (Ag*)}}=52\%=\frac{\text{KN (AgAb)}}{\text{KN (Ag)}}$$

Chiếu giá trị B /F lên đường cong chuẩn suy ra lượng kháng nguyên tương ứng.



Hình 8.8. Kỹ thuật định lượng bằng miễn dịch phóng xạ



Hình 8.8. Kỹ thuật ELISA tìm kháng thể của HIV

Hạt nhựa được bao bằng kháng nguyên HIV đem phối hợp với huyết thanh bệnh nhân. Nếu huyết thanh chứa kháng thể HIV, kháng thể gắn với kháng nguyên trên mặt hạt (a). Hạt bấy giờ được ủ với kháng thể kháng globulin đã được gắn enzym peroxydase của cây cải ngựa. Kháng thể gắn với kháng thể trên hạt và tích lũy enzym (b). Cơ chất của enzym được cho vào và đem ủ (c). Màu vàng cam xuất hiện trong hỗn hợp khi enzym chuyển cơ chất thành hợp chất có màu, điều này là dấu hiệu dương tính của kháng thể HIV. Nếu không có màu, thử nghiệm là âm tính, nghĩa là không có kháng thể (d).

Nguyên tắc: Kháng thể hoặc kháng nguyên được gắn trên một bề mặt cứng và sau đó sẽ kết hợp lớp này với các vật liệu phản ứng. Hệ thống enzym sau đó được liên kết với phức hợp. Rửa bỏ enzym còn dư và đo lượng enzym đã tác động bằng máy đo quang.

Kỹ thuật ELISA có thể thay đổi dựa trên việc người ta muốn xác định kháng nguyên hay kháng thể. Pha rắn có thể là những hạt bi, đĩa giấy, phiến nhựa và hệ thống enzym có thể là phosphatase kiềm. Kỹ thuật này cũng có thể dùng để định lượng bằng cách đo một lượng kháng nguyên hay kháng thể phản ứng với enzym - cơ chất. ELISA được thực hiện trên những bộ kit với giá không đắt và được dùng rộng rãi trong phòng thí nghiệm huyết thanh học.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Kỹ thuật dùng phát hiện hỗn hợp kháng nguyên:

a. Kháng thể huỳnh quang	c. Ngưng kết

b. ELISA	d. Kết tủa trong gel

2. Các yếu tố ảnh hưởng kết quả trong kỹ thuật kháng thể huỳnh quang:

a. Bản chất của chất phát huỳnh quang	c. Kỹ thuật cá nhân

b. Bản chất của kháng thể	d. Thiết bị phát hiện huỳnh quang

3. ELISA cho kết quả chính xác hơn các phản ứng huyết thanh thông thường khác vì:

a. Có sự tham gia của enzym

b. Có sự liên kết kháng kháng thể và enzym chuyển màu cơ chất

c. Nhờ thiết bị đo màu chính xác

d. Tất cả

4. Ưu điểm của phản ứng huyết thanh:

a. Nhanh chóng

b. Chính xác

c. Dễ thực hiện

d. a, b đúng

5. Cấu trúc quyết định tính đặc hiệu trong phản ứng huyết thanh:

a. Kháng nguyên

b. Hapten

c. Kháng thể

d. Tất cả

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Phạm Văn Ty. ***Miễn dịch học***. NXB Đại học Quốc Gia, 2001.
2. Daniel P. Stites & al. ***Basic and clinical immunology***. 6th edition, 1987.

Bài 9

PHẢN ỨNG QUÁ MẪN

MỤC TIÊU

1. *Phân biệt được phản ứng quá mẫn và miễn dịch.*
2. *Nắm được đặc điểm, phân loại các phản ứng quá mẫn.*
3. *Nêu được những ứng dụng và cách trị liệu đối với một số phản ứng quá mẫn.*

Phản ứng miễn dịch có tính chất bảo vệ cơ thể. Nhưng vào năm 1902, Portier và Richet đã nghiên cứu tính độc của dịch chiết hải quì thấy có hiện tượng lạ: khi tiêm vào chó lần hai dịch chiết này cách lần một ba tuần thì chó chết sau vài phút. Đó là sự phản vệ. Sau đó hiện tượng này được tìm thấy ở bọ với nhiều kháng nguyên không độc.

Von Pirquet dùng từ dị ứng để chỉ hiện tượng trên. Đây là miễn dịch hư hỏng đối với một chất xâm nhập lần thứ hai. Vậy sự quá mẫn là tình trạng bảo vệ hư hỏng gây nên bởi kháng nguyên và phản ứng bệnh. Phản ứng chỉ xảy ra khi kháng nguyên xâm nhập lần hai, kháng nguyên được gọi là dị ứng nguyên (allergen). Do đó miễn dịch là sự gia tăng sức đề kháng còn dị ứng là sự gia tăng nhạy cảm.

1. QUÁ MẪN VÀ MIỄN DỊCH

Quá mẫn là một hình thức của miễn dịch, tuy nhiên giữa quá mẫn và miễn dịch có sự khác biệt như sau.

1.1. Giống nhau

- Quá mẫn hay miễn dịch đều cần sự gây nhạy và một sự kích động. Sự xâm nhập của kháng nguyên lần thứ hai mới gây tai hại. Điều này được lưu ý khi sử dụng để tiêm huyết thanh trị liệu.
- Cơ chế cũng là phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc phản ứng do tế bào.
- Sự quá mẫn và miễn dịch đều có thể di chuyển bằng huyết thanh có chứa kháng thể hay lympho bào nhạy cảm.

1.2. Khác nhau

Khác biệt chính là phản ứng quá mẫn có tính chất cá nhân gây bất lợi, miễn dịch có tính chất phổ biến cho nhiều người, là phản ứng có lợi.

2. PHÂN LOẠI

Người ta phân loại phản ứng quá mẫn theo thời gian xảy ra phản ứng, khi kháng nguyên xâm nhập lần hai. Sự phân loại này cũng phản ánh cơ chế phản ứng.

2.1. Phản ứng kiểu tức thời

Kháng thể là IgE, phản ứng xảy ra dưới 15 phút sau khi kháng nguyên xâm nhập lần hai và kéo dài 30 phút gồm phản vệ và atopy (tạng dị ứng).

Phản ứng phản vệ (anaphylaxis)

Phản ứng thực nghiệm

Quá trình thử nghiệm

Ví dụ: Thử nghiệm ở chuột lang gồm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Gây nhạy. Cần một kháng nguyên thích hợp (tiêm 1 μg protein).
- Giai đoạn 2: Chờ 2-3 tuần để cho Ig gắn lên tế bào đa nhân ưa kiềm. Sau khi kháng nguyên gắn lên kháng thể, tế bào này sẽ phóng thích những chất trung gian gây tai hại trong vòng 3-5 phút.
- Giai đoạn 3: Giai đoạn kích động. Phải dùng lại kháng nguyên gây nhạy ở liều cao để có nhiều phức hợp kháng nguyên-kháng thể trên tế bào, từ đó mới có đủ chất trung gian gây tai hại.

Phản ứng

- Phản ứng tổng quát: Phản ứng xảy ra khắp cơ thể. Ở chuột lang nếu tiêm kháng nguyên vào mạch máu ở giai đoạn kích động thì sau 1-3 phút có thể có sốc gây nghẹt thở do co thắt cuống phổi, mũi, hầu rồi chết.

  Tất cả dị ứng nguyên đều gây một kiểu triệu chứng như nhau trên cơ trơn nhưng không chuyên biệt. Ví dụ: chuột lang bị nghẹt thở; thỏ bị trụy tim.

- Phản ứng trên da: Nếu tiêm kháng nguyên vào da của thỏ đã gây nhạy, nơi tiêm sẽ đỏ và sưng, sau 30 phút thì hết.

- Phản vệ thụ động: Xảy ra khi di chuyển phản vệ hay di chuyển tăng cảm. Nếu tiêm huyết thanh của chuột lang đã gây nhạy vào chuột lang bình thường thì nơi tiêm sẽ được gây nhạy sau 24 giờ. Lúc đó, tiêm kháng nguyên vào mạch máu cùng với phẩm màu Bleu Evans thì chỗ tiêm huyết thanh có màu xanh do gia tăng thẩm thấu mao quản.
- Phản vệ trên cơ quan: Phản vệ trên cơ quan riêng lẻ. Đem tử cung cắt từ chuột lang đã gây nhạy cho vào dung dịch Tyrode rồi cho kháng nguyên vào, tử cung sẽ co giật. Phản ứng này chứng tỏ tác động của kháng nguyên trên cơ trơn.

Phản vệ ở người

Phản vệ tổng quát

Phản ứng xảy ra sau 5-15 phút, tối đa là nửa giờ sau khi tiêm liều kích động. Biểu hiện ngứa, khó thở, trụy tuần hoàn, sốc, chết do phù cuống họng, ngừng hô hấp và loạn tim. Phản vệ kiểu này xảy ra với dược phẩm, nọc rắn, nọc ong.

Phản vệ trên da

Nếu tiêm dị ứng nguyên vào da một người đã được gây nhạy thì 2-3 phút sau sẽ ngứa nơi tiêm, nổi mụn xung quanh hoặc bao bởi một vùng ban đỏ, đạt kích thước tối đa sau 10 phút, kéo dài khoảng 20 phút rồi từ từ biến mất.

Tạng dị ứng

Sự phản vệ tổng quát tai hại nhưng hiếm. Ngược lại tạng dị ứng chiếm tới 10% dân số. Chúng ta có thể dị ứng với dị ứng nguyên trong môi trường xung quanh. Hiện tượng dị ứng được biểu hiện bởi những triệu chứng bộc phát và phản ứng trên da. Tạng dị ứng có xu hướng di truyền trong gia đình.

Người mẫn cảm có thể bị gây nhạy bởi dị ứng nguyên trong môi trường do hít vào dị ứng nguyên (phấn hoa, bụi ...) hay do ăn. Biểu hiện thông thường ở đường hô hấp gây viêm mũi hay suyễn. Kháng nguyên vào mũi gây sưng, viêm phần lớn do phấn hoa. Dị ứng do thức ăn gây ra ở đường tiêu hóa (ngứa, nổi mày đay do ăn ốc, tôm, cua).

Suyễn dị ứng có những triệu chứng như nghẹt cuống phổi, chảy mũi, có thể điều trị bằng kháng histamin, điều trị co cuống phổi dùng theophylin. Nên điều trị phối hợp tốt hơn. Khi nổi mày đay dùng thuốc kháng histamin.

Trắc nghiệm của phản ứng tức thời

Trắc nghiệm trên da: Tiêm dị ứng nguyên trong da (0,1 ml) sau 3-5 phút sẽ có ngứa nơi tiêm rồi mẩn đỏ.

Nhỏ mắt: Nhỏ vào một mắt dung dịch kháng nguyên rồi nhỏ vào mắt kia dung dịch muối sinh lý, mắt ngứa đỏ ở chỗ nhỏ dị ứng nguyên.

Phản ứng P-K (Prausnitz-Kustner)

Ở người mẫn cảm nhưng phản ứng trên da có thể đôi khi không cho kết quả. Người ta tiêm vào da người này huyết thanh của người đã gây nhạy cảm. Sau đó cho dị ứng nguyên, sẽ cho phản ứng nổi ban đỏ. Phản ứng này để chẩn đoán người có dị ứng hay không.

Trị liệu

Dược phẩm

Nguyên tắc: Ngăn chặn sự phóng thích của chất trung gian hay ức chế chất trung gian.

Trị liệu:

- Ngăn chặn sự phóng thích của chất trung gian AMP_c.
- Chống lại chất trung gian: dùng kháng histamin, chỉ công hiệu trong viêm mũi, viêm kết mạc, nổi mề đay, trường hợp sốc thuốc kháng histamin chỉ là chất phụ.
- Phản ứng phản vệ tổng quát dùng adrenalin.
- Hen dùng kháng histamin.
- Viêm da dùng corticoid.

Sự giải phản vệ

Cấp tính

Tai hại của phản vệ là do phóng thích ồ ạt một lượng lớn chất trung gian.

Nếu tiêm một lượng nhỏ dị ứng nguyên cách nhau 15 phút thì phức hợp dị ứng nguyên-IgE có ít nên không có nhiều chất trung gian phóng thích gây tai hại. Phương pháp này được áp dụng để dùng huyết thanh trị liệu hoặc dược phẩm cho người tăng cảm với tất cả sự dè dặt.

Mạn tính

Cho dị ứng nguyên cách tuần vào người mẫn cảm, dị ứng nguyên này sẽ tạo kháng thể ngăn chặn IgE xuất hiện ở huyết thanh. Nếu người mẫn cảm gặp dị ứng nguyên, IgG ngăn chặn không cho dị ứng nguyên gặp IgE.

2.2. Phản ứng bán cấp tính

Kháng thể là IgG hay IgM, phản ứng xảy ra sau 1-3 giờ và kéo dài 10-15 giờ do phức hợp miễn dịch kháng nguyên-kháng thể. Phản ứng loại này gồm bệnh huyết thanh và phản ứng Arthus. Khi phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể giảm trong mô và tạo vết thương: phản ứng Arthus. Nếu phức hợp kháng nguyên-kháng thể di chuyển trong máu, rồi gắn vào tế bào thận chẳng hạn, gây viêm tiểu cầu thận dẫn đến bệnh huyết thanh.

Kháng nguyên (thường là hapten) còn gắn trên tế bào máu rồi kháng thể gắn vào kháng nguyên tạo phức hợp miễn dịch với sự hỗ trợ của bổ túc thể sẽ ly giải tế bào máu gây thiếu máu tiêu huyết.

Phản ứng Arthus

Kháng nguyên gắn vào mô, nhất là màng trong của mạch máu. Kháng nguyên xâm nhập lần hai kết hợp với kháng thể và tạo kết tủa với sự hỗ trợ của bổ túc thể, phức hợp này gây tụ tập bạch cầu hạt. Do đó nếu diệt phức hợp sẽ gây ly giải màng tế bào làm phóng thích lysozym tạo viêm mạch và hoại tử mô.

Bệnh huyết thanh

Xảy ra do tiêm huyết thanh trị liệu khác loài, nghĩa là tiêm một lượng lớn protein lạ, sau một tuần lượng protein giảm do dị hóa nhưng kháng thể đã được thành lập đối với protein còn lại. Vì có đủ kháng nguyên nên phức hợp kháng nguyên-kháng thể không được sa thải hết bởi hệ thống lưới nội mô. Phức hợp miễn dịch di chuyển theo máu có thể gắn vào tế bào và đặc biệt là cuộn tiểu cầu hay tế bào mạch máu tạo viêm mạch.

3. PHẢN ỨNG KIỂU CHẬM

Xảy ra sau 1-2 giờ và kéo dài nhiều giờ đến nhiều tuần.

3.1. Đại cương

Nếu tiêm kháng nguyên trong da của người đã gây nhạy thường sẽ gây phản ứng cục bộ. Phản ứng xảy ra sau 24 giờ bằng một nốt dưới da. Đó là phản ứng quá mẫn kiểu chậm khác với phản ứng Arthus (30 phút đến 10 giờ).

Quá mẫn kiểu chậm là một dạng của miễn dịch tế bào tuần hoàn không có sự tham dự của kháng thể.

Ở da có tế bào Langerhans là một tế bào có nhiệm vụ nhận kháng nguyên nhưng không thực bào và có vai trò trong phản ứng quá mẫn kiểu chậm.

3.2. Những loại phản ứng quá mẫn kiểu chậm

Phản ứng quá mẫn kiểu chậm gồm hai giai đoạn:

- Giai đoạn cảm ứng (gây nhạy): Thời gian này cơ thể tiếp xúc với dị ứng nguyên.
- Giai đoạn biểu lộ: Khi kháng nguyên xâm nhập da tạo phản ứng cục bộ đặc biệt.

Phản ứng quá mẫn kiểu chậm sau bệnh nhiễm

Phản ứng tuberculin

Cơ thể bị nhiễm bởi vi khuẩn lao hay tiêm ngừa bằng BCG trở nên quá mẫn với cấu tử của vi khuẩn lao. Pha cảm ứng xảy ra trong vài tuần. Sau đó nếu tiêm tuberculin (chiết xuất protein của vi khuẩn lao) trong da thì sau 24 giờ nơi tiêm có một ban đỏ, đạt kích thước tối đa sau 48-72 giờ. Tuberculin lúc đầu được sử dụng là vi khuẩn lao OT (Old Tuberculin). Hiện nay dùng PPD (Protein Purified Derivative) từ OT làm tinh khiết. Phản ứng tuberculin chứng minh cơ thể đã tiếp xúc với vi khuẩn lao hay đã chủng ngừa. Phản ứng này là dạng quá mẫn kiểu chậm cổ điển. Sự kiện này có thể xảy ra trong phổi giúp giới hạn vi khuẩn tại chỗ. Phản ứng tổng quát của tuberculin có thể thực hiện bằng cách tiêm vào phúc mạc của chuột lang để gây sốt.

Phản ứng sau bệnh nhiễm khác

Phản ứng sau bệnh nhiễm có thể xảy ra với nhiều vi khuẩn khác như *Brucella*, từ vi khuẩn này chiết được ***brucellin*** cũng cho phản ứng quá mẫn kiểu chậm ở người tiếp xúc với *Brucella*.

Phản ứng quá mẫn kiểu chậm do tiếp xúc ở da (viêm da do tiếp xúc)

Nhiều chất có phân tử lượng thấp dưới 1.000 dalton có thể phối hợp với protein trong da để trở thành dị ứng nguyên. Khi tiếp xúc lần thứ hai sẽ gây viêm da do tiếp xúc. Những chất này rất đa dạng như mỹ phẩm, thuốc nhuộm tóc, xi măng, sơn mài, Co^{2+}, Hg^{2+} ...

Một bệnh khá phổ biến là viêm da do tiếp xúc là bệnh eczema-dị ứng do tiếp xúc với các chất kể trên. Trị liệu là làm vô trùng vết thương và sử dụng corticoid nhưng vấn đề chính là tránh tiếp xúc với dị ứng nguyên.

3.3. Phản ứng quá mẫn kiểu chậm và bảo vệ chống bệnh nhiễm

Miễn dịch tế bào có tác dụng quan trọng chống vi sinh vật nội bào như vi khuẩn nội bào, virus nội bào bằng hai cách:

- Phản ứng viêm với sự tụ tập đại thực bào có tính diệt vi sinh vật cao.
- Tạo tế bào lympho T_c chống tế bào nhiễm virus, nhiễm khuẩn.

Tuy nhiên phản ứng quá mẫn kiểu chậm dương tính đối với một loại vi sinh vật không có nghĩa là cơ thể được bảo vệ. Một người có tuberculin dương tính thì đã bị nhiễm vi khuẩn lao chứ không phải sa thải vi khuẩn lao. Đây là phản ứng miễn dịch hư hỏng.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Sự quá mẫn khác với sự miễn dịch ở chỗ:

    a. Có sự tham gia của tế bào miễn dịch

    b. Có sự tham gia của kháng thể và tế bào miễn dịch

    c. Có sự tham gia của đại thực bào

    d. Có tính cá nhân

2. Tính chất của phản ứng tăng cảm kiểu tức thời:

    a. Xảy ra do sự kết hợp kháng nguyên-kháng thể

    b. Xảy ra khắp cơ thể

    c. Luôn gây tử vong

    d. Xảy ra ở lần đầu tiếp xúc kháng nguyên

3. Đặc điểm của tạng dị ứng:

    a. Có tính chất di truyền

    b. 10% dân số mắc phải

    c. Không nguy hiểm

    d. Tất cả

4. Cách điều trị tốt nhất bệnh dị ứng do tiếp xúc ở da:

    a. Dùng thuốc kháng dị ứng

    b. Dùng thuốc kháng viêm + thuốc kháng sinh

    c. Không tiếp xúc với kháng nguyên

    d. Tất cả

5. Để giảm các triệu chứng trong bệnh huyết thanh có thể:

a. Sử dụng huyết thanh kháng với lượng nhỏ

b. Sử dụng kéo dài thời gian

c. Dùng thuốc kháng dị ứng

d. Dùng thuốc kháng viêm

e. a, c

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

Phạm Văn Ty. ***Miễn dịch học.*** NXB Đại học Quốc Gia, 2001.

Daniel P. ***Stites & al. Basic and clinical immunology***. 6th edition, 1987.

Bài 10

SỰ ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH Ở VI KHUẨN

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được các cơ chế tác động của kháng sinh.*
2. *Phân biệt được các loại đề kháng kháng sinh.*
3. *Nắm được các cơ chế đề kháng kháng sinh.*

1. PHÂN LOẠI

Một chủng vi khuẩn đề kháng với kháng sinh khi có thể sinh trưởng được với sự hiện diện của một nồng độ kháng sinh cao hơn nhiều lần nồng độ ngăn chặn sự sinh trưởng của các vi khuẩn khác.

Có hai loại đề kháng kháng sinh.

1.1. Đề kháng tự nhiên

Sự đề kháng của tất cả các chủng trong cùng một loài hoặc cùng một chi đối với một loại kháng sinh là đề kháng tự nhiên.

Ví dụ: Enterococcus đề kháng tự nhiên với lincomycin.

Cơ sở di truyền của đề kháng loại này chủ yếu là nhiễm sắc thể. Sự đề kháng tự nhiên có tính di truyền theo loài.

1.2. Đề kháng thụ nhận

Đề kháng thụ nhận là đề kháng xuất hiện do có sự đột biến nhiễm sắc thể từ một chủng vi khuẩn bình thường nhạy cảm hoặc vi khuẩn nhận được gen đột biến đề kháng từ bên ngoài.

Đặc điểm của loại đề kháng này là phát triển và thay đổi theo thời gian và cách sử dụng kháng sinh, có tính chất khu vực.

Đề kháng thụ nhận do đột biến nhiễm sắc thể

Một số tác nhân như kháng sinh (polypeptid,...), chất hóa học, tia tử ngoại có thể gây đột biến ở vi khuẩn, tạo gen đột biến đề kháng kháng sinh.

Đặc điểm của loại đề kháng này:

- Chiếm tỷ lệ thấp so với các loại đề kháng khác (10-20%).
- Thường xảy ra với tần số rất thấp: 10^{-9}-10^{-10}.
- Không cho đề kháng đa kháng sinh vì tần số đột biến cùng lúc hai điểm rất thấp.

Sự đề kháng này đi kèm với sự chọn lọc nghĩa là kháng sinh diệt vi khuẩn nhạy cảm và để lại vi khuẩn đề kháng. Sự phân tán các vi khuẩn đề kháng tùy theo chủng vi khuẩn.

Đề kháng do vi khuẩn tiếp nhận gen đề kháng

Vi khuẩn ban đầu nhạy cảm có thể nhận gen đề kháng dưới dạng plasmid hoặc do gen nhảy.

Plasmid chịu trách nhiệm sự đề kháng kháng sinh gọi là yếu tố R. Yếu tố này gồm:

- Gen *r* chịu trách nhiệm tạo tính đề kháng. Một plasmid có thể chứa nhiều gen đề kháng với nhiều loại kháng sinh.
- Yếu tố RTF giúp plasmid có thể được truyền sang vi khuẩn khác.

Sự đề kháng kháng sinh do plasmid quan trọng vì có khả năng di chuyển sự đề kháng sang vi khuẩn cùng loài hoặc loài lân cận.

Đặc điểm của sự đề kháng này:

- Chiếm tỷ lệ cao (80-90%).
- Tần số đề kháng cao: 10^{-6}.
- Gây đề kháng chéo dẫn đến đề kháng đa kháng sinh.
- Xảy ra tự động hoặc do tải nạp.

2. CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG CỦA KHÁNG SINH TRÊN TẾ BÀO VI KHUẨN

2.1. Những con đường để kháng sinh vào tế bào vi khuẩn

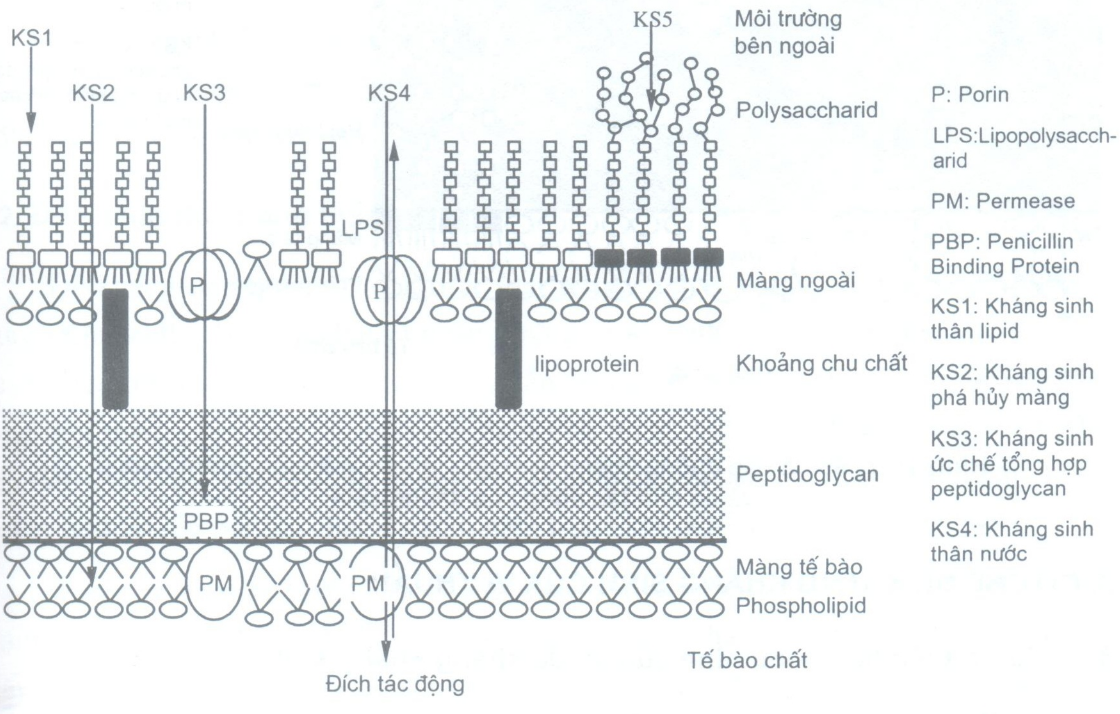
Kháng sinh muốn tác động trên tế bào vi khuẩn cần phải đến được điểm đích tác động. Tùy theo vị trí tác động kháng sinh cần phải xuyên sâu nhiều hay ít qua lớp thành tế bào vi khuẩn. Nếu vi khuẩn có những cấu trúc bên ngoài phức tạp như có nang, glycocalix, màng ngoài thì kháng sinh cần phải đi qua những lớp này.

Thành tế bào là đích tác động đầu tiên của một số kháng sinh như các kháng sinh thuộc họ β-lactam nên sự xuyên sâu ở đây không cần thiết.

Những kháng sinh thân lipid (acid fusidic, macrolid, rifampicin) bị lớp màng ngoài của vi khuẩn Gram âm ngăn chặn, không thể đến được điểm tác động nằm trong tế bào chất của vi khuẩn; trong khi ở vi khuẩn Gram dương, các kháng sinh này có tác động do vi khuẩn không có lớp màng ngoài.

Những kháng sinh thân nước (β-lactam, aminosid, quinolon ...) có thể xuyên qua thành tế bào vi khuẩn Gram âm nhờ porin. Điểm tác động của β-lactam là PBP (Penicillin Binding Protein) nằm ở mặt ngoài của màng tế bào chất nên kháng sinh không cần vượt qua lớp màng này.

Kháng sinh có đích tác động nằm ở tế bào chất, phải khuếch tán xuyên qua lớp lipid (như kháng sinh thân lipid) hoặc nhờ một enzym permease (đối với những kháng sinh khác) để vào tế bào.

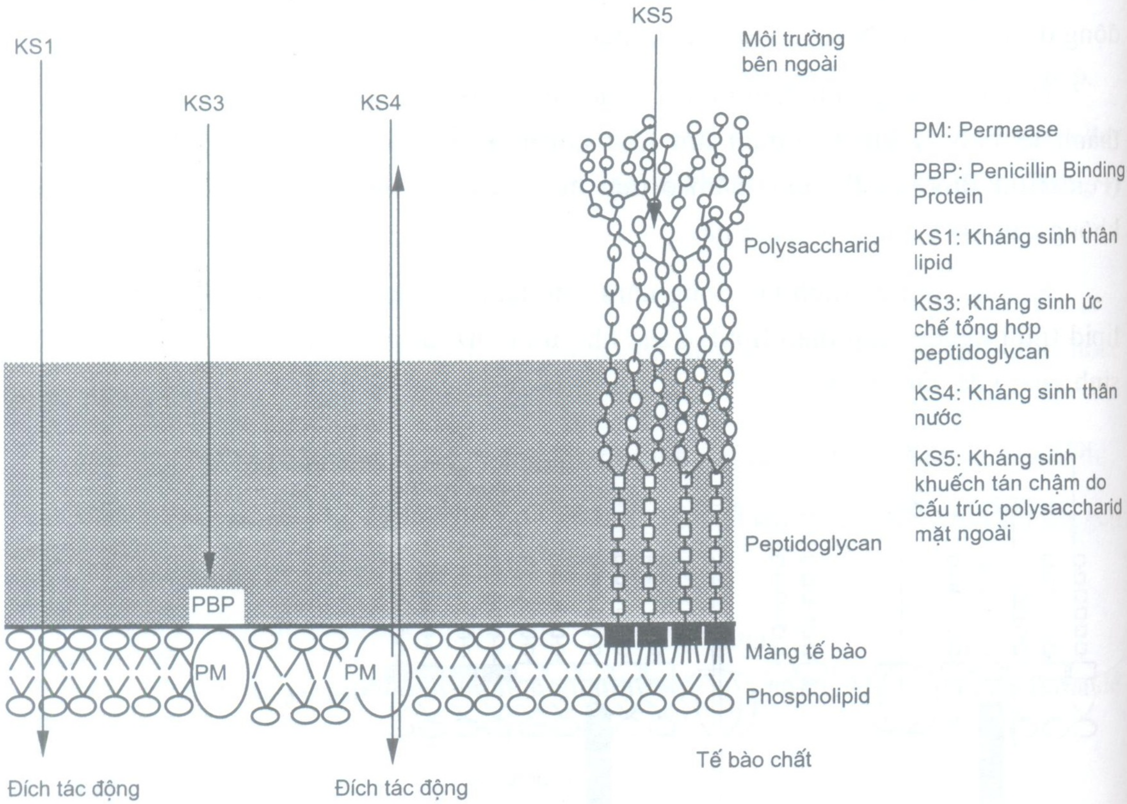


Hình 10.1. Sơ đồ các đường kháng sinh vào tế bào vi khuẩn Gram âm và cơ chế tác động của kháng sinh

2.2. Cơ chế tác động của kháng sinh

- Polypeptid cố định trên phospholipid, phá hủy lớp màng ngoài và màng tế bào chất.
- β-lactamin, fosfomycin, glycopeptid (vancomycin) ức chế sự tổng hợp peptidoglycan.

– Một số kháng sinh (aminosid, macrolid, tetracyclin, chloramphenicol) cố định trên ribosom, ức chế sinh tổng hợp protein.



Hình 10.2. Sơ đồ các đường kháng sinh vào tế bào vi khuẩn Gram dương và cơ chế tác động của kháng sinh

3. CƠ CHẾ ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN

3.1. Những biểu hiện kiểu hình của sự đề kháng kháng sinh

Sự đề kháng kháng sinh có thể thay đổi tùy theo môi trường. Điều kiện nuôi cấy đặc biệt là thành phần cation hóa trị 2 đóng vai trò quan trọng trong sự biểu hiện tính đề kháng. Sự biến đổi này liên quan đến sự thay đổi về MIC: MIC của kháng sinh trên Pseudomonas tăng từ 2-4 lần đối với tetracyclin, 0-128 lần đối với gentamycin, 0-256 lần đối với polymycin B và 0-16 lần đối với carbenicillin.

Vai trò của cation hóa trị 2 đã được nghiên cứu đặc biệt trong sự đề kháng đối với polymycin. Vài chủng Pseudomonas đột biến ở protein màng ngoài có khả năng nhân lên nhiều trong môi trường nghèo chất dinh dưỡng nhưng có Ca^{2+}, Mg^{2+}... ở đây có sự gia tăng đáng kể của protein H_1, protein này làm lệch hướng những protein lớn hơn ở màng. Những protein đó tác động như chất thay thế các cation hóa trị 2 trên vị trí quan trọng của màng nơi có thể bị các kháng sinh cation tấn công. Điều này chứng tỏ không phải do đột biến điểm đích mà do sự thay đổi kiểu hình của điểm đích. Kết quả này lại khẳng định đến việc sử dụng một thành phần Ca^{2+}, Mg^{2+} đã được kiểm soát trong môi trường.

Sự đề kháng cũng thay đổi rất nhiều tùy thuộc vào sự tăng trưởng của vi khuẩn và những yếu tố giới hạn sự tăng trưởng. Điều đó giải thích sự không phù hợp giữa đề kháng *in vitro* có sự tăng trưởng cao và không bị giới hạn bởi những yếu tố trong môi trường với đề kháng *in vivo* có sự tăng trưởng chậm hơn nhiều khi có mặt những yếu tố giới hạn.

Sự biểu hiện tính đề kháng cũng được tìm thấy trong những điều kiện đặc biệt. Ví dụ, sự đề kháng của Staphylococci với methicillin trong môi trường có nồng độ muối cao (NaCl 2,5%) và ở 30°C rõ hơn trong môi trường đẳng trương và ở nhiệt độ 37°C.

3.2. Đề kháng do không thấm

Đề kháng liên quan đến cấu trúc bên ngoài của vi khuẩn. Ở những vi khuẩn có nang (Klebsiella, Hemophilus...) hoặc những vi khuẩn tiết ra slime, kháng sinh phải xuyên qua lớp rào chắn này. Lớp rào chắn làm giảm sự khuếch tán kháng sinh, lớp càng dày thấm càng yếu. Sự trao đổi điện tích màng ngoài vi khuẩn cũng ảnh hưởng đến tính thấm của kháng sinh: những kháng sinh cation cần phải bão hòa những nhóm cation tự do ở lớp polysaccharid ngoại biên trước khi đến được lớp màng ngoài.

Slack và Nichols (1986) đã chứng minh *in vitro* sự suy giảm tính thấm của các aminosid ở những chủng Pseudomonas có exopolysaccharid. Tác động này không tìm thấy ở những kháng sinh β-lactam trung tính hoặc tích điện âm. Nhưng ở những thử nghiệm khác người ta lại chứng minh được tác động của vancomycin không thay đổi trên *Staphylococcus epidermidis* khi những vi khuẩn này thay đổi việc tạo ra slime.

Theo Vaara và Viljanen (1993), chuỗi polysaccharid ở mặt ngoài của lipopolysaccharid ở *Proteus mirabilis* được thay thế bởi β-aminoarabinose làm cho nó có tính acid hơn ở những chủng khác. Sự thay thế này cho phép giải thích sự đề kháng tự nhiên của Proteus với polycation (polymycin).

3.3. Đề kháng liên quan đến cấu trúc màng ngoài

Đề kháng kháng sinh thân lipid

Cơ chế này giải thích một số đề kháng tự nhiên. Những kháng sinh ưa lipid (macrolid, acid fusidic, rifampicin) không có khả năng xuyên qua lớp màng ngoài của vi khuẩn Gram âm. Cấu trúc không đối xứng của màng ngoài với những lipopolysaccharid ở mặt ngoài giải thích sự thấm không bình thường của một màng sinh học đối với những thành phần thân lipid. Tính chất không đối xứng này được tìm thấy chủ yếu ở vi khuẩn đường ruột. Những vi khuẩn Gram âm (Hemophilus, Neisseria) gặp ở màng nhầy của vật chủ có một lớp màng ngoài đối xứng hơn và nhạy cảm hơn đối với macrolid.

Đề kháng kháng sinh thân nước

Những phân tử thân nước đi qua lớp màng ngoài nhờ các porin có tính đặc hiệu nhiều hay ít. Sự khuếch tán này phụ thuộc bản chất, số lượng porin và đặc tính chức năng của porin nhưng cũng tùy thuộc vào tính chất của kháng sinh (điện tích, kích thước, mức độ thân nước).

Sự giảm bớt, biến mất hay thay đổi đặc tính chức năng của một vài porin sẽ dẫn đến sự giảm tính thấm của kháng sinh vào vi khuẩn, làm những vi khuẩn này ít nhạy cảm hơn với kháng sinh đó. Ở *E. coli*, hai porin chủ yếu đã được biết là *OmpF* và *OmpC*, đó là những porin ba chiều được mã hóa bởi gen *ompF* và *ompC* và sự phiên mã của chúng được kiểm soát bởi các gen *ompR*, *envZ* và có thể chịu nhiều đột biến. Cơ chế đề kháng này thường hay gặp ở vi khuẩn đường ruột và chi Pseudomonas, dẫn đến sự giảm hoạt tính kháng sinh của tất cả kháng sinh tác dụng bằng đường này như β-lactamin, aminosid, quinolon, trimethoprim, chloramphenicol. Từ đây, người ta tìm ra những chủng đề kháng đa kháng sinh trong quá trình trị liệu.

Ngược lại, Trias và Nikaido (1983) đã chứng minh Pseudomonas có một porin D2 chịu trách nhiệm trong sự chuyên chở chuyên biệt những carbapenem. Những porin chuyên biệt giải thích sự đề kháng một cách chuyên biệt với các imipenem, không có sự đề kháng chéo với những β-lactamin hay các kháng sinh thân nước khác của Pseudomonas. Ở vi khuẩn đường ruột, sự đề kháng với imipenem tìm thấy ở *Enterobacter cloacea, Enterobacter aerogenes* và *Providencia rettgeri* có liên quan một phần đến sự thay đổi những porin không chuyên biệt của màng ngoài. Moxalactam có khả năng chọn lọc những đề kháng về tính thấm.

3.4. Đề kháng liên quan đến sự thay đổi tính thấm của màng tế bào chất

Ngược lại với sự vận chuyển thụ động của màng ngoài, sự chuyên chở qua màng tế bào chất là sự chuyên chở chủ động cần năng lượng. Những vi khuẩn kỵ khí hay vi hiếu khí và những vi khuẩn lên men giai đọan đầu như Streptococcus có thế năng ở màng và một hệ thống chuyên chở electron yếu và dẫn đến không tạo được ATP. Nên những vi khuẩn này không có năng lực gắn và hấp phụ những phân tử aminosid. Điều này giải thích sự đề kháng tự nhiên của vi khuẩn với kháng sinh trên.

Ngoài ra, người ta chứng minh sự đề kháng cao của vi khuẩn đường ruột với tetracyclin. Những vi khuẩn này có protein màng có khả năng làm thất thoát năng lượng khi có mặt kháng sinh. Do đó làm cho tetracyclin đi ra. Sự đề kháng là do có một lối thoát kháng sinh dẫn đến sự giảm nồng độ kháng sinh nội bào. Một cơ chế tương tự với sự đề kháng các quinolon đã được mô tả ở *Staphylococcus aureus*. Gen đề kháng (Nor A) dẫn đến sự thay đổi một acid amin của protein này so với gen hoang dại ban đầu. Sự đột biến này làm tăng phóng thích quinolon khỏi tế bào, bình thường điều này xảy ra ở mức độ thấp với những vi khuẩn không đề kháng.

3.5. Đề kháng do sự thay đổi đích của kháng sinh

Sự liên kết kháng sinh - điểm đích liên quan đến cấu trúc của điểm đích. Nhiều đột biến khác nhau có thể làm giảm tính đặc hiệu của kháng sinh.

Cơ chế này gặp ở một số kháng sinh như β-lactamin, aminosid, quinolon, rifampicin, sulfamid, bactrim và liên quan đến một số lớn các chủng thuộc các chi Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Enterobacteria, Clostridium ....

Hiệu lực của những kháng sinh β-lactam liên quan đến khả năng gắn vào PBP. Đó là những enzym chịu trách nhiệm trong sự sinh tổng hợp peptidoglycan.

Ở *Staphylococcus aureus*, sự đề kháng với methicillin thường do sự tổng hợp một PBP mới, gọi là PBP2a hay PBP2' và do có sự gắn kết yếu với PBP mới tổng hợp. Sự đột biến làm xuất hiện sự đề kháng chéo đối với tất cả β-lactamin. *In vitro*, sự biểu hiện của PBP mới dễ dàng xảy ra khi Staphylococcus tăng trưởng trong môi trường có nồng độ muối cao hay ủ ở 30°C. Mặt khác, sự đề kháng methicillin cũng có thể do ái lực yếu của β-lactamin với PBP bình thường hay sự tiết quá nhiều β-lactamase.

Sự đột biến của PBP cũng giải thích sự đề kháng của phế cầu khuẩn đối với các penicillin. Sự đề kháng này đôi khi biểu hiện rất yếu, khó phát hiện *in vitro* bằng phương pháp kiểm tra thông thường. Do đó, để phát hiện sự đề kháng của oxacillin người ta không chỉ dựa vào kháng sinh đồ. Người ta thường thử tính nhạy cảm bằng phương pháp kháng sinh đồ của thuốc trước rồi tiếp theo xác định MIC. Những đề kháng với β-lactamin thường hay xuất hiện ở vi khuẩn Gram dương và ít gặp hơn ở vi khuẩn Gram âm như *Hemophillus influenzae*, *Neisseria gonorrhoe, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa*.

Sự đề kháng của *Acinetobacter baumannii* với imipenem cũng liên quan đến sự thay đổi của PBP.

Đối với những aminosid, sự thay thế một acid amin trong protein của ribosom dẫn đến sự giảm ái lực của kháng sinh với ribosom. Để có biểu hiện lâm sàng, cần phải có nhiều đột biến, điều này giải thích việc hiếm gặp cơ chế đề kháng ở họ kháng sinh này.

Đích tác động của quinolon là các tiểu đơn vị của ADN-gyrase, enzym tháo xoắn ADN vi khuẩn. Sự phong bế những enzym này làm thay đổi sự sinh tổng hợp acid ribonucleic. Nhiều đột biến được mô tả do vi khuẩn tổng hợp tiểu đơn vị A của ADN-gyrase ít nhạy cảm hơn với quinolon.

Cầu khuẩn Gram dương đề kháng theo một hướng khác đối với macrolid, lincosamid và streptogramin do methyl hóa ARN, điều này làm giảm ái lực của các kháng sinh này đối với ribosom. Staphylococci biểu hiện kiểu đề kháng có thể dưới hai dạng: không cảm ứng và cảm ứng. Dạng cảm ứng chỉ có ở erythromycin, oleandomycin. Khi có mặt những kháng sinh này sẽ gây đề kháng cảm ứng và người ta đã quan sát thấy một kiểu giống sự đề kháng với macrolid, lincosamid và với streptoGramin B.

Sự đề kháng với rifampicin liên quan đến một đột biến ở tiểu phần β của ARN polymerase làm mất khả năng gắn của kháng sinh lên điểm đích.

3.6. Đề kháng do làm mất hoạt tính của kháng sinh

Vi khuẩn có khả năng tổng hợp enzym làm biến đổi hay phá hủy hoạt tính kháng sinh. Cơ chế này thường gặp ngày càng nhiều trong các đề kháng với β-lactamin, các aminosid, chloramphenicol và fosfomycin. Những enzym này có thể nằm trong tế bào chất (enzym phân hủy aminosid), nằm ở khoảng quanh tế bào chất hoặc ngoài tế bào (β-lactamase). Sự đề kháng này phụ thuộc vào khả năng tiết, loài, số lượng plasmid hiện diện hoặc tùy thuộc khả năng biểu hiện gen mã hóa sự tổng hợp enzym. Những gen mã hóa cho các enzym thuộc loại đề kháng này chỉ tác động đến một họ kháng sinh (ví dụ β-lactamin) nhưng chỉ một plasmid có thể mang nhiều nhóm gen dẫn đến sự đề kháng nhiều họ kháng sinh khác nhau (ví dụ β-lactamin và aminosid).

Đề kháng với aminosid

Aminosid bị mất hoạt tính bởi acetyltransferase (AAC), phosphotransferase (APT) và nucleotidyltransferase (ANT). Mỗi enzym nhận ra một họ kháng sinh tương ứng và có nhiều mức độ đề kháng phụ thuộc vào loại enzym và tế bào vật chủ. Việc phát hiện tính đề kháng đôi khi khó khăn. Ví dụ, những vi khuẩn đường ruột có thể có một AAC 6' chịu trách nhiệm làm mất tác động của amikacin trong khi đó 30% chủng tiết ra enzym này lại có một vòng ức chế trên kháng sinh đồ chuẩn.

Thông thường sự đề kháng biểu hiện có sự giảm đường kính vòng vô khuẩn rất rõ ràng đối với kanamycin, tobramycin, netilmycin và ít hơn ở amikacin.

Đề kháng với β-lactam

Cơ chế đề kháng với β-lactamin thường liên quan đến việc tiết ra β-lactamase. β-lactamase là những enzym có tác động mở vòng β-lactam làm mất hoạt tính kháng sinh. Sự phân loại β-lactamase tùy thuộc đặc tính hóa lý, bản chất chất ức chế, vị trí gen (plasmid hoặc nhiễm sắc thể), ký chủ thường gặp, trình tự nucleotid trên gen, hoặc thành phần acid amin, vị trí enzym ở vi khuẩn (phía ngoài tế bào hay khoảng không quanh tế bào chất), những cơ chất tương ứng.

Penicillinase là một nhóm không đồng nhất gồm một số enzym tác động chủ yếu trên penicillin. Penicillinase có tác động yếu trên cephalosporin thế hệ I, tùy thuộc bản chất và lượng enzym vi khuẩn tiết ra. Phối hợp một β-lactamin với chất ức chế β-lactamase (acid clavulanic, sulbactam...) sẽ khôi phục lại một phần tác động của β-lactamin. Những penicillinase có thể đặc hiệu đối với một chi (ví dụ penicillinase của Staphylococcus) hoặc một vài chi. Enzym nhóm TEM 1 đã được tìm thấy ở những vi khuẩn đường ruột, Hemophilus, Neisseria, Pasteurella, Pseudomonas. Các penicillinase thường có nguồn gốc từ plasmid, còn enzym nhóm SHV1 có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể.

3.7. Đề kháng do thay đổi chuyển hóa ở vi khuẩn

Các sulfamid và trimethoprim ức chế con đường chuyển hóa dẫn đến việc tổng hợp các base purin và pyrimidin. Các vi khuẩn đề kháng bằng cách tăng việc sản xuất tiền chất của đường chuyển hóa (acid p-aminobenzoic) do sự tăng tổng hợp các enzym dihydropteorat synthetase và dihydrofolat reductase (các enzym này bị ức chế bởi kháng sinh) hoặc tạo ra những enzym có ái lực yếu đối với các kháng sinh.

3.8. Đề kháng với nhiều họ kháng sinh

Sự kháng với nhiều họ kháng sinh gặp ở những chủng đề kháng đa kháng sinh trong bệnh viện, làm cho việc chọn các phác đồ điều trị đôi khi rất hạn chế. Sự đề kháng này có thể chỉ do một cơ chế (sự không thấm) hoặc nhiều cơ chế độc lập nhau như ở Staphylococci đề kháng với methicillin (tiết penicillinase, đột biến PBP, làm mất hoạt tính enzym) và đột biến ribosom dẫn tới sự mất hoạt tính macrolid, lincosamid và streptoGramin B.

Ngược lại, có những trường hợp đặc biệt, đề kháng với một kháng sinh sẽ làm tăng tác động của kháng sinh khác. Ví dụ gen *tec* chịu trách nhiệm đề kháng với tetracyclin làm gia tăng sự thấm của những aminosid vào vi khuẩn Gram âm.

Một dạng đề kháng khác gọi là "dai dẳng" (persistance) đã được khám phá. Trái với những kiểu đề kháng trên, cơ chế kháng ở đây liên quan đến sự mất hay giảm cấu trúc hoặc chức năng của gen. Sự thay đổi chuyển hóa của vi khuẩn giải thích tính bền của vi khuẩn in vivo khi có mặt kháng sinh. Nhưng sau khi ngưng điều trị bằng kháng sinh, sẽ có một áp lực chọn lọc mạnh để vi khuẩn trở về những chủng ban đầu. Ở đây có sự mất chuyển hóa cảm ứng làm giảm độc lực hoặc giảm tốc độ tăng trưởng vi khuẩn. Loại đề kháng này thường tìm thấy ở một số họ kháng sinh: β-lactamin, aminosid, quinolon, tetracyclin, rifampicin và polymycin.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Đặc điểm của đề kháng thụ nhận:

a. Chiếm tỷ lệ thấp

b. Gây đề kháng chéo

c. Có thể mất đi

d. Tần suất đề kháng thấp

e. b, c đúng

2. Những cấu trúc giúp vi khuẩn đề kháng theo cơ chế không thấm:

a. Nang

b. Lớp nhày

c. Polysaccharid mặt ngoài

d. Thành tế bào

e. a, b, c

3. Vi khuẩn đề kháng với cephalosporin thường do:

a. Đột biến ở gen tạo porin

b. Sản xuất enzym

c. Đột biến ở điểm đích

d. Đột biến ở màng ngoài

4. Vi khuẩn đề kháng được với kháng sinh nhóm penicillin thường do:

a. Tiết enzym penicillinase

b. Thay đổi cấu trúc peptidoglycan

c. Thay đổi PBP

d. Tất cả

5. Đặc điểm của đề kháng tự nhiên là:

a. Phân suất cao

b. Có thể mất đi

c. Có thể di truyền

d. Là loại đề kháng nguy hiểm

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet. ***Manual de Bacterologie Clinique***. 2nd edition, Elsevier, 1994

2. Edward Alcamo. ***Fundamentals of Microbiology***. 4th edition, 1993. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Phần III

VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Bài 11

VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT

MỤC TIÊU

1. *Phân biệt được đặc điểm của nhóm vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt và gây bệnh cơ hội.*
2. *Nắm được các phương pháp nhận định vi khuẩn.*
3. *Ứng dụng được vào phòng ngừa và trị liệu.*

1. PHÂN LOẠI

Đây là nhóm lớn, gồm nhiều loại vi khuẩn khác nhau, sống ở đường ruột. Sự hiện diện của chúng trong ống tiêu hóa khác nhau tùy theo vị trí, tuổi tác và thay đổi tùy theo chế độ ăn uống.

Hệ vi khuẩn đường ruột phức tạp nên việc phân loại chúng dựa trên nhiều quan điểm khác nhau: theo họ hoặc theo khả năng gây bệnh của vi khuẩn hoặc kết hợp cả hai, trong đó cần lưu ý đến tính chất hiếu khí hay kỵ khí và tính kháng nguyên.

1.1. Họ Enterobacteriaceae

Vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt

Gây bệnh với các triệu chứng bệnh lý, không hội sinh, đôi khi ở dạng bệnh nhiễm không biểu lộ gồm các chi Salmonella, Shigella. Bệnh truyền do vệ sinh môi trường kém, nhiễm do tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp qua nước uống, thức ăn nhiễm phân hay qua trung gian động vật.

Vi khuẩn gây bệnh cơ hội

Hệ vi khuẩn hội sinh

E. coli, Aerobacter, Klebsiella... Khi có cơ hội xâm nhập (như chấn thương hay thủ thuật y tế), chúng đi vào máu gây nhiễm ở những cơ quan như nhiễm trùng niệu. Trong tự nhiên, sự hiện diện của chúng trong nguồn nước cho biết nước đã bị nhiễm phân người hay động vật, nên có thể nhiễm các vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt có thể có trong phân, hoặc nhiễm Enterococcus, virus bại liệt, viêm gan virus... do phân bệnh nhân.

Hệ vi khuẩn hoại sinh

Proteus, Providencia, Serratia... Trong tự nhiên có trong đất, nước, phân nhiễm vào do thức ăn hay vật dụng của người hay do thủ thuật y tế.

1.2. Họ Pseudomonaceae

Đáng lưu ý có *Pseudomonas aeruginosa* (cũng hiện diện trong không khí, đất gây bệnh cơ hội ở đường niệu, mắt) và *Vibrio cholerae* (nay xếp vào họ Vibrinoaceae) gây bệnh chuyên biệt.

1.3. Nhóm vi khuẩn lactic

Nhóm này gồm một số vi khuẩn có khả năng lên men tạo acid lactic như các chủng *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum*... Đây là những vi khuẩn có lợi trong ruột. Sự hiện diện của chúng trong ruột tùy theo lứa tuổi, thường có nhiều trong ruột trẻ sơ sinh.

2. ĐẶC ĐIỂM NUÔI CẤY

Phần lớn vi khuẩn đường ruột phát triển dễ dàng trên môi trường thông thường, hiếu khí, kỵ khí tùy ý. Chúng khác nhau về khả năng sử dụng carbohydrat, và yếu tố này được dùng để phân biệt nhóm vi khuẩn hay loài. Các loại đường hay sử dụng để phân biệt là: glucose, lactose, saccharose, mannitol... Nhóm vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt thì không lên men lactose, trong khi nhóm vi khuẩn cơ hội lên men được lactose. Trong nhóm này người ta còn phân biệt loại lên men lactose nhanh (18-24 giờ sau khi ủ) và lên men lactose chậm (24-48 giờ sau khi ủ). Điều này cho phép thực hiện các phản ứng sinh hóa để định danh vi khuẩn đường ruột hoặc sử dụng các môi trường nuôi cấy thích hợp để phân lập chúng từ bệnh phẩm. Để phân lập vi khuẩn gây bệnh đường ruột có thể phải sử dụng một hệ thống môi trường gồm: môi trường phong phú, môi trường dinh dưỡng, môi trường phân biệt, môi trường chọn lọc.

3. KHÁNG NGUYÊN

3.1. Kháng nguyên O

Đây là kháng nguyên của thành tế bào vi khuẩn, cấu tạo bởi lipopolysaccharid, có những đặc tính sau: chịu được nhiệt, không bị cồn phá hủy nhưng bị hủy bởi formol và rất độc (chỉ cần 1/20 mg là giết chết chuột nhắt sau 2 giờ). Kháng nguyên này khi xâm nhập cơ thể có thể gây sốt, giảm bạch cầu, sau đó tăng, giảm lympho bào và bạch cầu ưa acid (thấy ở bệnh nhân thương hàn hoặc sốt do nội độc tố). Kháng nguyên O khi gặp kháng thể sẽ xảy ra phản ứng ngưng kết, phản ứng này được sử dụng để phân biệt những typ huyết thanh khác nhau (serotype) trong các vi khuẩn cùng một loài.

3.2. Kháng nguyên H

Đây là kháng nguyên của tiêm mao có trên 50 loại khác nhau. Kháng nguyên H cấu tạo bởi protein, có đặc tính sau: không chịu được nhiệt, bị cồn phá hủy, không bị hủy bởi formol. Khi gặp kháng thể tương ứng sẽ xảy ra hiện tượng ngưng kết.

3.3. Kháng nguyên K

Đây là kháng nguyên của nang hay màng bao (outer coat), còn gọi kháng nguyên mặt ngoài, chỉ có ở một số loại vi khuẩn. Có hơn 100 loại khác nhau. Một số kháng nguyên K cấu tạo là polysaccharid, một số khác là protein. Kháng nguyên K nếu che phủ vi khuẩn, sẽ ngăn cản phản ứng ngưng kết kháng nguyên O và có liên hệ đến độc tính của vi khuẩn, ở Salmonella được gọi là kháng nguyên Vi.

Dựa vào thành phần của kháng nguyên O, H, K người ta sẽ định danh vi khuẩn chính xác và phân biệt được nhiều thứ trong một loài. Ví dụ *E. coli* có thể có công thức kháng nguyên: O_{55}, K_5, H_{21} ...

4. ĐỘC TỐ

4.1. Nội độc tố

Hầu hết các vi khuẩn đường ruột đều có nội độc tố, bản chất là lipopolysaccharid (LPS), chỉ được phóng thích ra ngoài khi vi khuẩn bị phá hủy. Nội độc tố bền với tác động của nhiệt, trọng lượng phân tử khá cao (100-900.000). Nội độc tố gây ra triệu chứng chung như sốt, nóng, giảm bạch cầu, hạ huyết áp, đông máu nội mạch rải rác.

Cấu trúc hóa học:

- *Dây oligosaccharid* (mannose-rhamnose-galactose): Tạo tính chuyên biệt của kháng nguyên.
- *Phần lõi:* Gồm N-acetylglucosamin-glucose-galactose và heptose giống nhau ở tất cả các vi khuẩn. Sườn luân phiên heptose và nhóm KDO (2-keto-3-desoxy-octulonic acid) với lipid A có độc tính.

4.2. Ngoại độc tố

Một số vi khuẩn tiết ra ngoại độc tố có vai trò bệnh lý quan trọng trong việc gây tiêu chảy và hội chứng lỵ *(Shigatoxin)*. Vài gốc *E.coli* sản xuất ngoại độc tố (*Enterotoxin*). Đây là một độc tố nhiệt hoại gồm 2 tiểu đơn vị A và B. B gắn vào màng tế bào ruột non và làm cho A dễ xâm nhập vào màng ruột. A kích thích adenylcyclase trong tế bào ruột non làm gia tăng quá trình tổng hợp AMP vòng (cAMP) sẽ kích thích tiết ion Cl^- và bicarbonat ra khỏi tế bào và ngăn chặn tái hấp thu Na^+ dẫn đến sự bài tiết muối gây tiêu chảy trầm trọng. Độc tố nhiệt hoại có cấu trúc, chức năng miễn dịch giống độc tố của *V. cholerae*. Vài gốc *E. coli* khác sản xuất enterotoxin bền với nhiệt, hoạt hóa men guanylcyclase làm tăng cGMP ở trong tế bào dẫn đến kích thích bài tiết muối, nước gây tiêu chảy.

Một số vi khuẩn đường ruột sản xuất bacteriocin (bacteriocin, colicin). Độc tố này có tác dụng kháng khuẩn đối với một số vi khuẩn cùng loài hay khác loài. Và có thể dùng bacteriocin để định typ vi khuẩn.

5. VI KHUẨN GÂY BỆNH ĐƯỜNG RUỘT

5.1. Chi Salmonella

Đặc điểm hình thể học và tính chất sinh hóa

Trực khuẩn Gram âm, di động, hiếu khí tùy ý, không lên men lactose, tạo H_2S, không tạo urease (dùng để phân biệt với chi Proteus), phản ứng MR dương tính, Indol âm tính. Một số tính chất khác thay đổi tùy theo loài. Vi khuẩn nuôi cấy được trên các môi trường thông thường. Các môi trường phân lập dựa trên yếu tố lên men hay không lên men lactose của vi khuẩn và sử dụng chất chỉ thị màu để nhận định. Các môi trường thường dùng để phân lập Salmonella là môi trường Mac Conkey, EMB, SS (cho khóm không màu), môi trường BSA (cho khóm đen ánh kim loại).

Trên môi trường rắn có thể có hai dạng khuẩn lạc:

- ***Dạng S***: khuẩn lạc nhẵn tròn, lồi.
- ***Dạng R:*** nhăn, không đều, dẹp khô.

Ngoài ra, các môi trường phân lập vi khuẩn đường ruột đều sử dụng muối mật để ngăn chặn vi khuẩn Gram dương, chỉ để vi khuẩn Gram âm phát triển.

Kháng nguyên và phân loại

Kháng nguyên

- *Kháng nguyên O:* Đánh số 1, 2, 3, 4... đến nay có hơn 60 typ.
- *Kháng nguyên H:* Là kháng nguyên của tiêm mao, có thể chỉ có ở một dạng duy nhất (phase 1) hay hai dạng (phase 1 và 2), điều này là do vi khuẩn có gen H_1và H_2. Ví dụ vi khuẩn *Salmonella paratyphi* A có kháng nguyên H chỉ có ở 1 phase trong khi đó *Salmonella typhimurium* có ở cả 2 phase.
- *Kháng nguyên Vi* (Virulence): Bao bọc quanh vi khuẩn, phía ngoài kháng nguyên O, có ở *Salmonella typhi*, *S. dublin*, *S. paratyphi* C. Kháng nguyên Vi do gen ViA, ViB qui định. Gen ViA chung mẫu huyết thanh giữa *Salmonella typhi* và *S. typhimurium* và vài loại *E. coli*.

Phân loại

Phân loại theo kháng nguyên (Serotype)

Quan trọng nhất là phương pháp của White -Kauffmann, dùng mẫu huyết thanh tương ứng để phân loại. Dựa trên sự khác biệt của các loại kháng nguyên, hiện nay người ta đã phân chia chi Salmonella ra hơn 2.200 mẫu huyết thanh khác nhau, được ký hiệu từ A đến E. Mỗi nhóm có một kháng nguyên O đặc trưng không đổi, phần còn lại có thể thay đổi.

Ví dụ: *S. typhi* A có kháng nguyên O2, *S. typhi* B có kháng nguyên O4, *S. typhi* C có kháng nguyên O6, *S. typhi* D có kháng nguyên O9, sau đó phân biệt tiếp tục dựa vào kháng nguyên H. Hiện nay đã biết kháng nguyên O đặc trưng cho nhóm tùy thuộc vào loại đường của dây Oligosaccharid trên kháng nguyên O.

Để xác định mẫu huyết thanh của chi Salmonella, tối thiểu phải có huyết thanh kháng O_4-O_5-O_6-O_7-O_8-O_9 mới có thể xác định được 90% chi Salmonella nhiễm cho người.

Phân loại theo mẫu tiêu giải (lysotype)

Mẫu được bổ sung sau khi phân biệt theo mẫu huyết thanh, dựa trên khảo sát sự nhạy cảm hay đề kháng của chủng vi khuẩn với một loại thực khuẩn chọn lựa. Ví dụ, với mẫu huyết thanh của *Salmonella typhi* có thể phân biệt thêm 103 mẫu tiêu giải, với mẫu huyết thanh của *Salmonella paratyphi* B phân biệt được thêm 48 mẫu tiêu giải.

Năng lực gây bệnh

Sốt thương hàn-phó thương hàn (Typhoid fever hay còn gọi Enteric fever)

Bệnh do vi khuẩn *S. typhi* (vi khuẩn thương hàn) hay *S. paratyphi* A, B, C (vi khuẩn phó thương hàn). Hiện nay vi khuẩn *S. paratyphi* B gọi là *S. scottmuleri*.

Vi khuẩn xâm nhập cơ thể qua thức ăn, nước uống bị nhiễm khuẩn. Đến ruột non, một số vi khuẩn qua niêm mạc ruột do bị cản bởi các hạch bạch huyết ở ruột. Tại đây chúng sinh sản nhanh. Khi sinh sản nhiều, một số vi khuẩn tự ly giải phóng thích nội độc tố, một số vượt qua được hạch bạch huyết vào máu gây tình trạng nhiễm khuẩn huyết (bactericemie). Từ máu, vi khuẩn đến các cơ quan khác gây viêm, thông thường chúng đến cư trú tại bàng quang hoặc túi mật rồi trở lại đường tiêu hóa. Do vậy có thời gian ủ bệnh (7-10 ngày), bệnh nhân sẽ sốt, cảm giác lạnh run xen kẽ nhau. Sốt tăng cao trong 5-7 ngày (có thể tới 41°C) và gây mệt lả, suy nhược, biếng ăn, có thể kèm theo gan, lách to. Nếu nhẹ, sau 3 tuần, triệu chứng giảm dần nhưng có thể có biến chứng loét ở ruột gây chảy máu và thủng ruột.

Ngộ độc thức ăn

Nguồn gốc là do thức ăn nhiễm vi khuẩn từ người hay thú (thường do *S. typhimurium*, *S. enterditis*). Sau thời gian ủ bệnh 8-48 giờ bệnh nhân sẽ bị nôn, tiêu chảy, đau đầu, sốt nhẹ. Bệnh thường khỏi sau 2-5 ngày. Ngoài ra sau giai đoạn nhiễm khuẩn huyết, vi khuẩn có thể gây tổn thương khu trú ở phổi, xương, màng não và không gây tổn thương ở ruột, khi đó phải cấy máu, dịch màng não, tủy xương để tìm vi khuẩn.

Chẩn đoán

Xét nghiệm trực tiếp tùy theo bệnh, giai đoạn bệnh mà bệnh phẩm có thể là máu, tủy xương, phân, nước tiểu

Cấy máu

Thực hiện ở tuần lễ đầu trong bệnh sốt thương hàn, tương ứng với giai đoạn vi khuẩn huyết, tỷ lệ cấy máu dương tính đến 90%. Sau đó tỷ lệ tìm được vi khuẩn chỉ còn 30-40% do vi khuẩn trở về cố định tại ruột. Trường hợp bệnh nhân đã điều trị kháng sinh thì phải lấy bệnh phẩm từ tủy xương.

Nếu âm tính nên cấy lặp lại với máu máu pha loãng 1/10.

Cấy phân

Ở bệnh sốt thương hàn nên cấy phân tuần lễ 3-4 khi chưa dùng kháng sinh, nên lặp lại nếu âm tính. Trong ngộ độc do nội độc tố của vi khuẩn, cấy phân ngay từ tuần đầu.

Cấy nước tiểu

Trong sốt thương hàn, cấy nước tiểu tỷ lệ dương tính thay đổi theo thời kỳ của bệnh và thường song song với tỷ lệ dương tính của cấy phân.

Xét nghiệm gián tiếp

Sau khi nhận định chi, cần dùng các phản ứng huyết thanh học để phân biệt các loài, nhóm, thứ của Salmonella. Dùng huyết thanh kháng chuyên biệt để nhận định.

Ngưng kết trên lame

Vi khuẩn trích từ cấy máu hay phân, trộn với huyết thanh kháng trên lame sau vài phút sẽ có phản ứng ngưng kết. Sau khi dùng huyết thanh kháng kháng nguyên O, ta sẽ biết vi khuẩn thuộc nhóm nào. Tiếp theo là phân biệt bằng huyết thanh kháng kháng nguyên H. Ví dụ: *S. paratyphi* B và *S. typhimurium* có cùng kháng nguyên O là 4-12, tiếp theo phân biệt bằng kháng nguyên H: *S. paratyphi* B có kháng nguyên H pha 1 còn *S. typhimurium* có pha 1 và 2.

Áp dụng trong bệnh sốt thương hàn và phó thương hàn để tìm kháng thể kháng kháng nguyên O và kháng nguyên H của *S. paratyphi* A, B, *S. typhi* trong huyết thanh bệnh nhân. Nồng độ kháng thể gia tăng vào tuần 2-3 (kháng thể kháng O xuất hiện vào ngày thứ 8, biến mất tháng thứ 3; kháng thể kháng H xuất hiện vào ngày thứ 1, tồn tại từ 6 tháng đến 1 năm). Thực hiện thử nghiệm 2 lần cách khoảng 7-10 ngày để tìm kháng thể. Cách thực hiện là pha loãng huyết thanh bệnh nhân với một nồng độ vi khuẩn thương hàn chuẩn. (hình 11.1).

Phòng ngừa

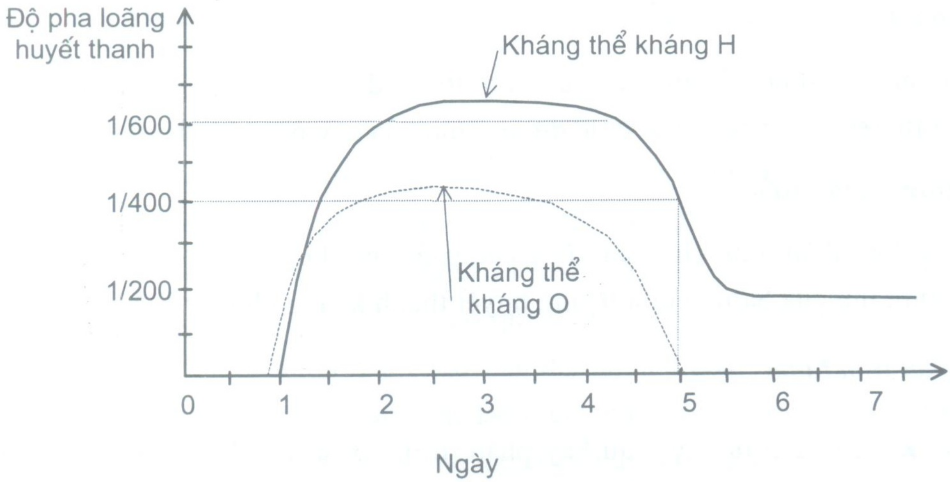
Kiểm soát dịch tễ học

Bệnh do Salmonella trước kia đã gây những dịch bệnh khá lớn. Nguồn lây lan do thực phẩm và thức uống bị nhiễm vi khuẩn, do đó cần kiểm soát:

– Nguồn nước bị nhiễm phân: thường gây các dịch.

– Thực phẩm bị nhiễm như: sữa, thịt, cá, trứng...

– Đặc biệt cần chú ý lây lan từ người đang mang mầm bệnh là nguy hiểm hơn cả. Người mắc bệnh sốt có thể tiếp tục mang vi khuẩn trong các cơ quan như bàng quang, đường mật, đường tiểu và trở thành mầm bệnh thường xuyên.



Hình 11.1. Sơ đồ phản ứng Widal

Phòng ngừa bệnh

Phải chú ý đến vệ sinh thực phẩm, nước uống, người mang mầm bệnh.

Hiệu quả nhất là tiêm vaccin TAB (Typhi, Paratyphi A, B). Tiêm 3 lần cách khoảng 9 tuần, 4 lần ở trẻ em và tiêm lại một lần sau một năm. Vaccin DTAB thêm một toxoid bệnh bạch hầu và DTTAB thêm một toxoid uốn ván (diphteriae, tetanus, typhi, paratyphi A, B). Cần tiêm chủng khi đi vào vùng dịch.

Trị liệu

Sốt thương hàn - Phó thương hàn

Biến chứng chủ yếu là xuất huyết tiêu hóa và thủng ruột. Tỷ lệ tử vong lên đến 10-15%. Ngày nay nhờ kháng sinh liệu pháp và bù nước, tỷ lệ tử vong giảm còn 1%.

Kháng sinh liệu pháp: Kháng sinh thường được sử dụng là chloramphenicol, ampicillin hay co-trimoxazol, cephalosprorin thế hệ thứ 3, fluoroquinolon. Hiện nay chloramphenicol đã bị đề kháng 25%. Sự đề kháng với ampicillin, co-trimoxazol cũng gia tăng.

Cần làm kháng sinh đồ để tránh sử dụng kháng sinh đã bị đề kháng. Chú ý sử dụng liều tăng dần dần, tránh giết nhiều vi khuẩn một lúc sẽ gây phóng thích nội độc tố ồ ạt.

Cần chú ý bù nước và chất điện giải, điều trị các triệu chứng. Đa số không cần dùng kháng sinh vì có thể làm cho Salmonella chậm đào thải khỏi đường ruột.

5.2. Chi Shigella

Đặc điểm hình thể - tính chất sinh hóa

Vi khuẩn được tìm thấy lần đầu năm 1988 bởi Chantemesse và Widal. Trực khuẩn Gram âm, không có tiêm mao, không di động, không sinh bào tử, không có nang và kỵ khí tùy ý. Vi khuẩn mọc dễ dàng trên các môi trường thông thường. Shigella lên men đường glucose nhưng không tạo gas (trừ *Shigella flexneri* typ 6 có sinh gas), không sinh H_2S và không sử dụng citrat. Hầu hết Shigella không lên men đường lactose (trừ *Shigella sonnei* nhưng chậm sau 2 ngày).

Kháng nguyên và phân loại

Shigella có kháng nguyên O, một số có kháng nguyên K, và vì không có tiêm mao nên không có kháng nguyên H. Các kháng nguyên O của Shigella khá gần với một số nhóm *E. coli*. Dựa vào kháng nguyên O và một số tính chất sinh hóa, người ta chia Shigella ra làm 4 nhóm:

- ***Nhóm A:*** *Shigella dysenteriae,* không lên men mannitol, có 10 serotype. Typ 1 còn gọi là trực khuẩn Shiga đã từng gây những dịch lớn.
- ***Nhóm B:*** *Shigella flexneri,* lên men mannitol, có 6 typ huyết thanh.
- ***Nhóm C:*** *Shigella boydii,* lên men mannitol, có 15 typ huyết thanh.
- ***Nhóm D:*** *Shigella sonnei,* lên men mannitol, chỉ có 1 typ huyết thanh.

Trong đó nhóm A gây bệnh nặng nhất. Ở Việt Nam, các nước đang phát trển thì hay gặp *Shigella dysenteriae* và *Shigella flexneri*. Trong khi đó ở Mỹ, Tây Âu thì hay gặp nhóm D.

Năng lực gây bệnh

Nhiễm khuẩn Shigella chỉ giới hạn ở đường tiêu hóa. Sau khi xâm nhập, vi khuẩn sẽ tấn công niêm mạc ruột già, tạo những vết loét rồi hoại tử, vi khuẩn có ở vết loét và một phần theo phân ra ngoài, không xâm nhập vào máu. Lỵ do vi khuẩn Shigella gây hội chứng lỵ với các triệu chứng: đau bụng quặn, đi tiêu 10-20 lần trong ngày, phân có nhiều chất nhầy và thường có máu. Triệu chứng bệnh do tác động của nội độc tố và ngoại độc tố. Nội độc tố là polysaccharid của vách tế bào vi khuẩn, được phóng thích khi tế bào ly giải và kích thích thành ruột. *Shigella dysenteriae* typ 1 tiết ra ngoại độc tố không bền với nhiệt, gọi là Shigatoxin tác động lên ruột và hệ thần kinh trung ương (Neurotoxin), tác động lên ruột giống độc tố nhiệt hoại của *E. coli*. *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* cũng có độc tố giống *Shigella dysenteriae* nhưng số lượng ít hơn nhiều. Bệnh nhiễm Shigella thường tự giới hạn, nhưng ở trẻ em, người già đôi khi có thể gây triệu chứng như mất nhiều nước, chất điện giải có thể gây chết, nhất là nhiễm *Shigella dysenteriae* typ 1.

Chẩn đoán

Cấy phân

Nên lấy phân tươi chỗ có chất nhầy trong thời kỳ đầu và chưa sử dụng kháng sinh. Bệnh phẩm cần xét nghiệm ngay, nếu đem đi xa cần cho vào môi trường chuyên chở giữ cho vi khuẩn còn sống.

Phân lập theo sơ đồ phân lập chung, giống như tìm Salmonella từ phân. Nếu cần thiết cũng cấy lên môi trường phong phú sau đó cấy lên môi trường Mac Conkey, SS, BSA, cần chú ý quan sát các khóm không lên men lactose. Tiếp theo quan sát bằng kính hiển vi và làm các phản ứng sinh hóa.

Phản ứng huyết thanh học

Để nhận định nhóm vi khuẩn cần thực hiện phản ứng ngưng kết với huyết thanh kháng (anti-serum) tương ứng trên vi khuẩn vừa phân lập. Ngoài ra có thể tìm trong máu bệnh nhân các kháng thể ngưng kết nhóm, tuy nhiên phản ứng ít có giá trị.

Phòng ngừa và trị liệu

Bị nhiễm Shigella trực tiếp từ phân hay gián tiếp do thức ăn, nước uống bị nhiễm phân. Vệ sinh cá nhân và môi trường kém, nơi đông người là điều kiện nhiễm bệnh thuận lợi. Cần cách ly bệnh nhân, tẩy uế chất thải và phát hiện người lành mang mầm bệnh (nhất là những người có liên quan đến chế biến thực phẩm). Vaccin sống của vi khuẩn Shigella đã làm giảm độc lực để phòng ngừa ở những vùng có khả năng xảy ra bệnh dịch, tuy nhiên cần lưu ý tính đặc hiệu và bảo vệ còn thấp.

Về trị liệu cần chú ý bù nước và chất điện giải, chất dinh dưỡng để tránh suy kiệt cơ thể, đồng thời sử dụng kháng sinh. Trước kia sulfamid rất công hiệu để trị Shigella, cần dùng loại không hấp thu ở ruột như sulfaguanidin. Hiện nay có nhiều chủng vi khuẩn đề kháng nhiều kháng sinh, muốn sử dụng kháng sinh có hiệu quả cần làm kháng sinh đồ. Các cephalosporin thế hệ III, các fluoroquinolon có tác dụng rất tốt, sau đó là co-trimoxazol và ampicillin.

5.3. *Vibrio cholerae*

Đặc điểm

Vi khuẩn tìm thấy năm 1854 bởi Filippo Pacini từ niêm mạc ruột của bệnh nhân. Vi khuẩn từng gây những bệnh dịch rộng lớn trên rất nhiều nước, gây chết nhiều. Tác nhân gây bệnh là phẩy khuẩn tả *V.cholerae* do Robert Koch phát hiện. Sau đó xuất hiện chủng Eltor, hiện nay đây là chủng chủ yếu gây bệnh trên thế giới.

Trực khuẩn Gram âm, lúc mới phân lập từ bệnh phẩm vi khuẩn cong như dấu phẩy, di động rất nhanh, có một tiêm mao ở một đầu. Nuôi cấy dễ dàng trên môi trường thông thường, ưa muối, mọc nhanh trong nước pepton kiềm pH 9. Lên men được saccharose, glucose.

Kháng nguyên -phân loại

Đa số vi khuẩn thuộc nhóm Vibrio có chung kháng nguyên H. Có 12 loài Vibrio gây bệnh ở người và không gây bệnh có 22 loài. *Vibrio cholerae* gây tả thuộc nhóm 01. Vi khuẩn tả nhóm 01 có 3 typ huyết thanh: Ogawa, Inaba, Hikojima. *V. parahaemolyticus* đa số gây ngộ độc thức ăn, viêm ruột.

Độc tố và enzym

Độc tố của vi khuẩn tả (cholera enterotoxin) là protein không bền với nhiệt, cấu tạo bởi tiểu đơn vị A và B. Phần B giúp độc tố gắn vào thụ thể trên bề mặt tế bào ruột là GM1. Sau đó tiểu đơn vị A vào được trong tế bào ruột làm tăng hoạt động của adenylcyclase khiến cho cAMP ở tế bào sản xuất quá nhiều gây hậu quả tăng tiết ồ ạt nước và chất điện giải từ tế bào thượng bì vào lòng ruột gây tiêu chảy, có thể mất 10-20 lít trong 24 giờ, trong khi đó các tế bào ruột không bị tổn thương. Enterotoxin của vi khuẩn tả có liên hệ với phản ứng kháng nguyên với độc tố nhiệt hoại của *E. coli*. Ngoài ra còn có hemolysin (ví dụ chủng Eltor), mucinase làm tróc niêm mạc thượng bì của ruột, neuramiridase làm tăng thụ thể tiếp nhận độc tố.

Năng lực gây bệnh

Sau thời gian ủ bệnh 1-4 ngày, bệnh đột ngột xảy ra, buồn nôn, nôn, tiêu chảy dữ dội, có thể mất 10-20 lít trong 1 ngày. Phân giống nước vo gạo, lỏng, lợn cợn, không có máu, mùi tanh. Tình trạng cấp tính có thể gây chết trong vài giờ do trụy tim mạch. Trong trường hợp nhẹ chỉ gây tiêu chảy bình thường, đây là nguồn lây. Ngoài ra vi khuẩn Vibrio còn có thể gây ngộ độc thức ăn (thường do *V. parahaemolyticus*).

Chẩn đoán

Bệnh phẩm là phân, mảnh chất nhầy trong phân. Nếu chuyển đi xa cần môi trường chuyên chở, tránh bị khô. Lấy phân trong thời kỳ đầu, chưa dùng kháng sinh. Trường hợp cấp bách, chỉ cần soi tươi, xem di động để có kết luận trị liệu sớm. Cần ngưng kết huyết thanh để xác định tiếp theo. Môi trường thường dùng: pepton kiềm, TCBS.

Phòng ngừa - Trị liệu

Nước là nguồn lây quan trọng gây dịch bệnh. Khi có các nguồn nước nơi ổ bệnh đều có vi khuẩn tả. Thức ăn cũng là nguồn lây nhiễm. Người mang mầm bệnh là nguồn lây khó phát hiện. Cần xử lý chất thải của người bệnh.

Việc tiêm phòng là bắt buộc khi đến vùng có dịch bệnh. Trước kia dùng vaccin từ vi khuẩn tả chết nhưng hiệu quả phòng ngừa kém, chỉ chống được phần B trong độc tố và phải tiêm. Hiện nay, có vaccin uống theo các hướng: vi khuẩn tả chết, vi khuẩn sống giảm độc.

Điều trị: Chủ yếu bù nước và chất điện giải kịp thời, uống dung dịch ORS hay truyền dịch Lactat Ringer tùy theo mức độ mất nước, cần thực hiện ngay từ đầu. Theo dõi thể trạng bệnh nhân.

Sử dụng kháng sinh chủ yếu là phòng dịch, như tetracyclin.

5.4. *Escherichia coli*

Đặc điểm sinh hoá

E. coli sống bình thường trong ruột người và động vật, nhiều nhất ở ruột già. Vi khuẩn thường thải ra ngoài thiên nhiên theo phân, do đó thường thấy trong nước, đất bị nhiễm phân. Việc phát hiện *E. coli* trong nguồn nước là một thử nghiệm chủ yếu, chứng tỏ nước có bị nhiễm phân hay không. Trước đây *E. coli* được xem như những vi khuẩn bình thường trong ruột, hiện nay có nhiều chủng được xem như một trong những tác nhân gây tiêu chảy, đặc biệt ở trẻ em.

Đây là một trực chuẩn Gram âm mang các tính chất cơ bản của vi khuẩn đường ruột: lên men glucose, lactose nhanh, tạo acid, tạo gas, nuôi cấy dễ trên các môi trường thường.

E. coli có đủ các kháng nguyên O, kháng nguyên H, một số chủng có kháng nguyên K (của nang).

Chúng có thể sản xuất ngoại độc tố (enterotoxin), hemolysin, enzym phá hủy một số kháng sinh (β-lactamase), bacteriocin.

Khả năng gây bệnh

Rất đa dạng tùy thuộc vị trí vi khuẩn xâm nhập. Gồm hai loại:

Nhiễm khuẩn ngoài ruột

Gặp ở nhiều bệnh khác nhau nhưng triệu chứng không đặc trưng và chúng được xem như những vi khuẩn gây bệnh cơ hội. Thường nhất là gây nhiễm đường niệu, có thể gây nhiễm bàng quang, thận, tuyến tiền liệt, ống dẫn trứng hay nhiễm khuẩn huyết (thường sau can thiệp phẩu thuật, thông tiểu ...), gây viêm màng não ở trẻ sơ sinh.

Nhiễm khuẩn ruột

Viêm ruột tiêu chảy ở trẻ nhỏ (Gastro-enterite infantile): Gây tiêu chảy ở trẻ dưới 2 tuổi (do EPEC: enteropathogenic *E. coli*) triệu chứng không đặc trưng.

Tiêu chảy hội chứng lỵ: Gây tiêu chảy với triệu chứng giống lỵ trực khuẩn, vi khuẩn xâm lấn màng ruột, phân có đàm, máu (do EIEC: Entero invasive) đôi khi có thể xuất huyết đại tràng (do EHEC: enterohemorragic). Các vi khuẩn nhóm này tiết ra toxin tương tự như shigatoxin nên còn gọi là SLT (Shiga like toxin).

Tiêu chảy hội chứng tả: Gây tiêu chảy triệu chứng giống bệnh tả. Bệnh thường xảy ra ở trẻ em các nước kém phát triển hoặc người lớn, đặc biệt là các du khách đến các nước kém phát triển (do ETEC). Bệnh do hai ngoại độc tố: độc tố nhiệt hoại, cấu trúc chức năng giống độc tố của vi khuẩn tả và độc tố bền với nhiệt kích thích enzym guanylcyclase gây tiêu chảy.

Chẩn đoán và trị liệu

Tùy theo bệnh mà bệnh phẩm có thể là phân, nước tiểu hay máu ... Trên môi trường Mac Conkey cho khuẩn lạc màu hồng hoặc trên môi trường EMB cho khuẩn lạc tím than ánh kim loại. Để phát hiện độc tố nhóm EPEC dùng phản ứng ngưng tập trên lam. Với nhóm ETEC dùng phương pháp ELISA để tìm độc tố nhiệt hoại. Có thể tiêm vi khuẩn vào dạ dày chuột để tìm độc tố bền với nhiệt. Thông thường vi khuẩn nhạy cảm với các kháng sinh tác động trên vi khuẩn Gram âm. Lựa chọn kháng sinh phù hợp với vị trí nhiễm khuẩn.

5.5. Chi Campylobacter

Đặc điểm

Trước kia vi khuẩn này thuộc chi Vibrio, nay để riêng. Có hai loại gây bệnh là *C. fetus* và *C. jejuni*.

Trực khuẩn Gram âm nhỏ, mảnh mai, hiếu khí, rất di động.

Nuôi cấy khó, cần môi trường phong phú và vi hiếu khí.

Năng lực gây bệnh

Truyền nhiễm do phân hay sữa, thịt chưa chín, đôi khi có thể do phân của chim và thú.

- *C. fetus*: Gây nhiễm khuẩn huyết nhưng hiếm.
- *C. jejuni:* Gây viêm ruột thông thường dạng ly, phân có mủ, máu. Gặp nhiều ở nước đang phát triển, đôi khi gây tiêu chảy nặng ở trẻ em hay thiếu niên có thể thành dịch (gia đình, trường học), thường gặp ở tháng nóng.

Trị liệu

Nhiễm khuẩn huyết do *C. fetus* dùng gentamycin. Trường hợp viêm ruột dùng neomycin, erythromycin. Trị liệu cần kéo dài 10-20 ngày.

Bảng 11.1. Các tác nhân thường gây tiêu chảy cấp tại các nước đang phát triển

Tác nhân gây bệnh		Tỷ lệ %	Kháng sinh đề xuất
Virus	Rotavirus	15-25	Không
Vi khuẩn	Enterotoxigenic *E. coli*	10-20	Không
	Shigella	5-15	Cotrimoxazol, Nalidixic acid
	Campylobacter jejuni	10-15	Không
	Vibrio cholearae 01	5-10	Tetracyclin
	Salmonella (Non-typhoid)	1-5	Không
	Enterophathogenic		Dùng kháng sinh tùy nơi nhiễm
	Escherichia coli	1-5	Không
Đơn bào	Cryptosproridium	5-15	Không
Không tìm thấy tác nhân gây bệnh		20-30	Không

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. *E. coli* được phân biệt sơ bộ với nhóm vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt ở ruột nhờ khả năng lên men:

a. Mannose

b. Lactose

c. Glucose

d. Mannitol

e. b và c

2. Để chẩn đoán trực tiếp bệnh thương hàn trong tuần lễ đầu, nên lấy mẫu bệnh phẩm từ:

a. Dịch tủy

b. Phân

c. Máu

d. Nước tiểu

e. b và c

3. Đặc tính nào **<u>không</u>** phải của cholera toxin:

a. Bền với nhiệt

b. Làm tăng hoạt động của adenylcyclase

c. Gây tróc niêm mạc ruột

d. Cấu tạo bởi tiểu đơn vị A và B

e. a và c

4. Có thể chẩn đoán *Vibrio cholerae* trong trường hợp cấp cứu bằng cách:

a. Cấy lên môi trường pepton – kiềm

b. Cấy lên môi trường TCBS

c. Quan sát cách vi khuẩn di động

d. Dùng phản ứng ngưng tập huyết thanh

e. a và b

5. Đặc điểm của Shigatoxin:

a. Bền với nhiệt

b. Tác động chủ yếu ở niêm mạc ruột

c. Có thụ thể gắn vào tế bào GM1

d. Giống độc tố LT của *E. coli*

e. Dễ được hấp thu vào máu

6. *Salmonella typhimurium* là vi khuẩn gây

a. Thương hàn

b. Phó thương hàn

c. Ngộ độc thức ăn

d. Ly

e. Dịch tả

7. Có thể phân biệt sơ bộ vi khuẩn thuộc chi Salmonella hay Shigella nhờ phản ứng:

a. Lên men lactose

b. Tạo H_2S

c. Tạo urease

d. Indol

e. MR-VP

8. Salmonella trên môi trường Mac Conkey cho khóm màu:

a. Trắng

b. Xanh

c. Vàng

d. Hồng

e. Tím than

9. *E. coli* gây tiêu chảy do:

a. Tiết enzym

b. Tăng số lượng vi khuẩn

c. Tiết độc tố

d. Tất cả

10. Nội độc tố vi khuẩn tả có bản chất là:

a. Lipopolysaccharid

b. Acid teichoic

c. Acid mycolic

d. Lipoprotein

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Madigan, Martinko and Parker. ***Brock Biology of Microorganisms***. 9th edition, 2000.
2. J. C. Sherris. ***Medical microorganisms***. 3rd edition, Prentice-Hall International Inc., 1994.
3. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet. ***Manual de Bacterologie Clinique***. 2nd edtion, Elsevier, 1994

Bài 12

VI KHUẨN GÂY BỆNH LÂY QUA ĐƯỜNG SINH DỤC

MỤC TIÊU

1. *Nắm được đặc điểm về hình thể, tính chất nuôi cấy và cách lây truyền.*
2. *Trình bày được năng lực gây bệnh, triệu chứng bệnh, biến chứng.*
3. *Nêu được các phương pháp xét nghiệm vi khuẩn học.*
4. *Ứng dụng được vào phòng ngừa và kháng sinh trị liệu.*

1. VI KHUẨN GÂY BỆNH LẬU: *Neisseria gonorrhoeae*

1.1. Đặc điểm

Vi khuẩn gây bệnh lậu do Neisser phân lập năm 1879 từ mủ ở đường sinh dục của bệnh nhân. Lậu cầu là tác nhân gây bệnh chuyên biệt chỉ có ở người, truyền nhiễm trực tiếp do quan hệ với người bệnh. Song cầu khuẩn Gram âm, đối nhau mặt bằng, giống hai hạt cà phê úp lại.

Nuôi cấy cần môi trường giàu chất dinh dưỡng, không khí ẩm và CO_2. Nếu bệnh phẩm nhiễm nhiều vi khuẩn khác, dùng môi trường Thayer -Martin có kháng sinh để phân lập.

1.2. Khả năng gây bệnh

Bệnh lậu phải được khảo sát ở cả hai giới, ở trạng thái cấp tính hay mạn tính.

Bệnh lậu ở đàn ông thường có triệu chứng viêm niệu đạo cấp tính, viêm phần ngoài, chảy mủ, tiểu buốt, gắt, rắt. Thời gian ủ bệnh từ 3-7 ngày. Nếu không điều trị khỏi hết, bệnh lan vào đường sinh dục gây viêm nhiễm tinh hoàn, tuyến tiền liệt dưới dạng mạn tính.

Bệnh lậu ở phụ nữ thường xảy ra âm thầm và mạn tính. Nơi nhiễm khuẩn đầu tiên là cổ tử cung, lan đến niệu đạo và âm đạo, tiết chất nhày có mủ. Bệnh có thể gây biến chứng viêm ống dẫn trứng. Một số vi khuẩn vào máu gây nhiễm lậu cầu lan tỏa.

Lậu cầu có thể nhiễm nơi khác: viêm kết mạc có mủ ở trẻ sơ sinh (do lây từ mẹ), gây biến chứng ở khớp (viêm khớp do lậu), nhiễm khuẩn huyết (viêm nội tâm mạc hay viêm màng não tủy).

1.3. Kháng nguyên

Lậu cầu có cấu trúc kháng nguyên không đồng nhất và có thể thay đổi cấu trúc bề mặt *in vitro*. Đây là tính chất được xem như để tránh sức đề kháng của ký chủ *in vivo*. Cấu trúc bề mặt gồm:

Pili giúp vi khuẩn bám vào tế bào ký chủ và chống lại sự thực bào.

Protein I tạo những lỗ nhỏ ở bề mặt qua đó một số chất dinh dưỡng đi vào được bên trong vi khuẩn. Mỗi chủng lậu cầu có một loại protein I riêng khác nhau về tính kháng nguyên.

Protein II làm kết dính các tế bào lậu cầu trong khóm và gắn lậu cầu vào tế bào ký chủ. Một chủng lậu cầu có từ 0-3 kiểu protein II. Protein II hiện diện ở khuẩn lạc đục, có thể có hay không ở khuẩn lạc trong.

Protein III có ở tất cả các lậu cầu, kết hợp protein I thành những lỗ nhỏ trên bề mặt tế bào.

Lipopolysaccharid có ở màng ngoài lậu cầu. Độc tính của lậu cầu phần lớn do LPS, tác động như nội độc tố.

Một số protein khác có tính kháng nguyên nhưng vai trò gây bệnh ít được biết.

1.4. Chẩn đoán

Lấy mẫu bệnh phẩm

- *Dạng cấp tính ở đàn ông:* Lấy mủ ở niệu đạo (có thể phải kích thích bằng cách cho uống rượu vào ngày trước).
- *Ở phụ nữ:* Lấy dịch âm đạo, dịch các tuyến hay lấy ở cổ tử cung sau khi có kinh (ngày thứ 4).

Xét nghiệm trực tiếp

Trải mủ, nhuộm Gram sẽ thấy cầu khuẩn dạng song cầu như hai hạt cà phê nằm trong hay ngoài bạch cầu. Sự hiện diện song cầu khuẩn trong tế bào bạch cầu và vị trí lấy bệnh phẩm là hai đặc điểm khẳng định bị bệnh lậu.

Ở phụ nữ hay người bị bệnh mạn tính, cầu khuẩn hiếm, nên trích bệnh phẩm tại phòng thí nghiệm và cấy ngay lên môi trường phong phú. Ở đàn ông, nếu khảo sát không thấy, nên cấy mủ.

Xét nghiệm gián tiếp

Chưa có phản ứng nhạy, chính xác. Áp dụng trong thấp khớp do lậu. Chỉ là phản ứng bổ túc, không thay thế cho việc cấy vi khuẩn được.

1.5. Trị liệu

Có thể dùng 10 triệu đơn vị penicillin/ngày trong 5-10 ngày hoặc dùng 5 triệu đơn vị procain penicillin và 1 g probenecid uống, có thể điều trị cả giang mai (nếu có). Nếu dị ứng với penicillin thì dùng tetracyclin, Bactrim với nồng độ cao và có thể chữa luôn bệnh do Chlamydia. Để điều trị cho phụ nữ liều tăng gấp đôi.

Hiện nay lậu cầu có sự đề kháng penicillin khá cao và trimethoprim - sulfamethoxazol. Có nhiều thuốc kháng sinh mới có thể trị với liều duy nhất: ceftriaxon (250 mg tiêm bắp), ciprofloxacin (500 mg), peflacin (400 mg), spectinomycin (2 g tiêm bắp).

2. VI KHUẨN GÂY BỆNH GIANG MAI: *Treponema pallidum*

2.1. Đặc điểm

Vi khuẩn *Treponema pallidum*, tác nhân gây bệnh giang mai (syphylis) chỉ có ở người. Việc lây truyền thường trực tiếp qua giao hợp với người bệnh. Chúng tồn tại trong các vùng kín, ẩm ướt của cơ thể. Vi khuẩn rất mỏng manh, nhanh chóng bị tiêu diệt khi ra ngoài cơ thể hoặc bởi nóng, khô.

Vi khuẩn rất nhỏ, có 6-14 vòng xoắn, bề ngang không quá 0,5 μm, chiều dài 6-15 μm. Di động đặc trưng hoặc theo trục, lắc ngang hay lượn sóng từ đầu này tới đầu kia, không nhuộm được theo Gram. Xoắn khuẩn giang mai không nuôi cấy được. Có thể nuôi cấy một số dòng Treponema không gây bệnh (Ví dụ, dòng Reiter, Kazan của *T. phagedenis*), nhưng xoắn khuẩn giang mai có khả năng gây bệnh trên một vài súc vật như thỏ (trên dịch tinh hoàn), dòng thường nghiên cứu là Nichol's.

2.2. Kháng nguyên

– ***Kháng nguyên lipid*** (cardiolipin): Kháng nguyên không chuyên biệt, còn có thể tìm thấy ở tim của các động vật có vú.

- *Kháng nguyên protein* có hai loại chuyên biệt chung cho Treponema và một hoặc hai kháng nguyên protein khác, có chuyên biệt ít nhiều cho *T. pallidum.*
- *Kháng nguyên polyosid* của vỏ, đặc trưng cho *T. pallidum.*

2.3. Khả năng gây bệnh

Thường phân chia theo thời kỳ:

- *Giang mai thời kỳ thứ I:* Sau khi tiếp xúc với bệnh nhân, xoắn khuẩn xâm nhập qua các vết xây xát ở da, niêm mạc vào hạch sau đó vào máu rất nhanh. Sau khoảng 3 tuần ủ bệnh, xuất hiện các vết loét, trợt nông tại cơ quan sinh dục, gọi là các săng, vài ngày sau thường có hạch thành chùm, nhỏ, rắn, không đau. Nguy hiểm là 6-8 tuần sau, dù không điều trị, các hạch cũng biến mất. Huyết thanh chỉ dương tính sau 5-8 tuần mắc bệnh.
- *Giang mai thời kỳ thứ II:* 6-8 tuần sau, có tổn thương ở da, niêm mạc lan tỏa khắp cơ thể gọi là đào ban giang mai do xoắn khuẩn giang mai theo máu đi khắp cơ thể. Đây là thời kỳ lây lan cho người tiếp xúc.
- *Giang mai thời kỳ thứ III:* Thường vào năm thứ 3 của bệnh, các tổn thương không lan tỏa như thời kỳ thứ II nhưng lại phá hủy cơ thể. Gồm có 3 thể. Đó là giang mai III lành tính, tạo các củ giang mai hay gôm loét; giang mai III tim mạch thường gây viêm động mạch chủ và giang mai III thần kinh gây tổn thương tủy sống, não, bệnh Tabes gây liệt toàn thân hay rối loạn tâm thần. Thời kỳ này ít lây.
- Ngoài các thể giang mai trên còn có thể giang mai bẩm sinh do mẹ mắc bệnh lây truyền cho thai nhi, xảy ra từ tháng thứ 4 của thai. Trẻ sinh ra có thể có những tổn thương của thời kỳ II hoặc gôm loét ở vách mũi, vòm họng gây xẹp mũi hay lủng vòm họng (tổn thương thời kỳ III). Do vậy cần thử máu cho sản phụ ít nhất 3 lần (tháng thứ 4, 6, 9 của thai).

Hiện nay bệnh giang mai không dễ dàng biểu lộ giống trước kia, có thể do điều trị không tốt hay sử dụng bừa bãi kháng sinh, có thể phân loại thành:

- *Giang mai sớm:* Tổn thương mới, rất nhạy cảm với trị liệu (có thể gồm giang mai thời kỳ I, II).
- *Giang mai muộn:* Tổn thương sâu, ít hiệu quả với trị liệu (thường sau thời kỳ II hoặc giang mai thời kỳ III).

2.4. Chẩn đoán

Xét nghiệm trực tiếp

Phương pháp này dùng để phát hiện xoắn khuẩn giang mai trong dịch tiết trên bề mặt săng bằng kính hiển vi nền đen. Tuy nhiên chủ yếu áp dụng trong thời kỳ huyết thanh chưa dương tính. Xét nghiệm này rất dễ bị sai do sử dụng kháng sinh bừa bãi khiến cho vi khuẩn không hiện diện trong săng nữa.

Xét nghiệm gián tiếp

Dựa trên đáp ứng miễn dịch thể dịch của bệnh nhân, gồm hai loại: xuất hiện các kháng thể không đặc hiệu *(Reagin)* và các kháng thể đặc hiệu kháng lại kháng nguyên chuyên biệt của xoắn khuẩn giang mai. Do vậy các phản ứng huyết thanh giang mai gồm hai loại: phản ứng đặc không hiệu *(Reagin test)* và các phản ứng đặc hiệu *(Specific treponemal test)*.

Các phản ứng không đặc hiệu dựa vào hiện tượng trong quá trình của một số bệnh, kể cả giang mai, cơ thể sẽ có kháng thể không đặc hiệu kết hợp được với các lipid lấy từ mô các động vật. Phản ứng có thể dương tính trong vài bệnh khác như sởi, lupus... hay bất thường ở từng cá nhân. Phản ứng không đặc hiệu gồm có phản ứng cố định bổ thể và phản ứng lên bông.

Phản ứng cố định bổ thể

Còn gọi phản ứng BW do Wassermann và cộng sự thực hiện đầu tiên năm 1906. Kháng nguyên sử dụng được chiết từ mô động vật như tim bò *(cardiolipin)*. Phản ứng gồm hai hệ thống: huyết thanh bệnh nhân + cardiolipin + bổ thể và sau đó cho thêm hệ thống chỉ thị là hồng cầu cừu + huyết thanh kháng hồng cầu cừu.

Nếu huyết thanh bệnh nhân có reagin, bổ thể giúp cho cardiolipin kết hợp với reagin nên hồng cầu cừu không còn bổ thể để phản ứng với huyết thanh kháng hồng cầu cừu, do đó không có phản ứng tan huyết dương tính. Ngược lại huyết thanh không có sẽ có phản ứng tan huyết.

Phản ứng lên bông

Nếu có trong huyết thanh, reagin sẽ ngưng tập với cardiolipin thành tủa bông có thể nhìn thấy được. Hiện nay có hai phản ứng thông dụng là VDRL và RPR.

– VDRL *(Veneral Disease Research Laboratory)*: Kháng nguyên là cardiolipin có thể dùng trên phiến kính hay trong ống nghiệm, có thể dùng định lượng được.

– RPR *(Rapid Plasma Reagin):* Kháng nguyên như trên, kết hợp với cholin và các phân tử carbon rất nhỏ làm chỉ thị. Kết quả dương tính khi có các cụm kết phân tử carbon thấy được bằng mắt thường.

Các phản ứng đặc hiệu

Các phản ứng này sử dụng xoắn khuẩn làm kháng nguyên. Độ chuyên biệt các phản ứng này cao hơn nhiều so với các phản ứng không đặc hiệu sử dụng kháng nguyên không phải là xoắn khuẩn. Kháng nguyên sử dụng thường là hỗn dịch *T. pallidum* dòng Nichol's từ mô tinh hoàn thỏ đã gây nhiễm khuẩn. Phản ứng đặc hiệu gồm có phản ứng bất động xoắn khuẩn, phản ứng miễn dịch huỳnh quang và phản ứng ngưng tập hồng cầu.

Phản ứng bất động xoắn khuẩn (TPI: Treponema pallidum* immobilisation*)

Do Nelson và Mayer tìm vào năm 1949. Các tác giả thấy rằng nếu huyết thanh bệnh nhân có các kháng thể chống xoắn khuẩn giang mai thì có khả năng *T. pallidum* còn sống và di động trở nên bất động với sự hiện diện của bổ thể. Sau khi tiếp xúc với huyết thanh 6-18 giờ, xoắn khuẩn giang mai sẽ bị bất động, biến đổi hình dạng và sẽ bị phá hủy. Kết quả được quan sát qua kính hiển vi nền đen, dương tính nếu có hơn 50% xoắn khuẩn bị bất động. Cần lưu ý nếu bệnh nhân đang sử dụng kháng sinh, phản ứng sẽ không có giá trị.

Phản ứng miễn dịch huỳnh quang (FTA: Fluorescent treponemal antibody)

Do Falcon, Deacon và Harris tìm năm 1957. Kháng nguyên là xoắn khuẩn cố định trên lam rồi cho tiếp xúc với huyết thanh bệnh nhân. Nếu có kháng thể, xoắn khuẩn sẽ bị bọc bởi kháng thể, sau đó được phát hiện với huyết thanh kháng globulin miễn dịch của người đã được gắn chất huỳnh quang. Kết quả được quan sát qua kính hiển vi nền đen với tia UV, sẽ thấy hiện tượng phát huỳnh quang nếu dương tính.

Đặc biệt phản ứng đã được cải tiến bằng cách xử lý hấp huyết thanh bệnh nhân với các xoắn khuẩn dòng Reiter để loại bỏ các kháng thể cấu trúc gần giống với kháng thể chuyên biệt cho *T. pallidum* gây bệnh. Đó là phản ứng **FTA-Abs** *(Fluorescent Treponemal Antibody Absorption)*

Phản ứng ngưng kết hồng cầu (Treponema pallidum* hemagglutination*: TPHA)

Trong phương pháp này hồng cầu cừu được làm nhám bề mặt, sau đó gắn kết với các kháng nguyên của xoắn khuẩn dòng Nichol's rồi cho tiếp xúc với huyết thanh bệnh nhân. Nếu có kháng thể chuyên biệt, hồng cầu sẽ bị ngưng tập. Ở ống chứng âm, hồng cầu sẽ bị đóng cục tại đáy ống nghiệm. Cũng có thể tăng mức độ chuyên biệt của phản ứng qua xử lý huyết thanh bệnh nhân như trong FTA -Abs.

Trị liệu

Penicillin có tác dụng diệt khuẩn tuyệt đối, được dùng từ năm 1943 tới nay. Tuy nhiên tác dụng điều trị phụ thuộc vào giai đoạn, bản chất bệnh, mối liên hệ giữa liều dùng và thời gian sử dụng. Sử dụng penicillin điều trị giang mai phải đạt nồng độ thích hợp trong máu duy trì một thời gian dài vì thời gian thế hệ của xoắn khuẩn là 30-33 giờ. Chính vì vậy người ta có khuynh hướng dùng penicillin chậm như procain penicillin G. Trong giang mai I và II, điều trị bằng penicillin luôn thành công. Trong giang mai muộn, tỉ lệ thành công giảm và cần tăng liều kháng sinh.

Trường hợp quá mẫn penicillin, thuốc dùng thay thế là tetracyclin hoặc erythromycin.

3. VI KHUẨN GÂY BỆNH HẠ CAM MỀM: *HAEMOPHILUS DUCREYI*

3.1. Đặc điểm

Hạ cam mềm là bệnh nhiễm trùng có tính chất cấp tính, thường khu trú. Bệnh lây lan do quan hệ tình dục với người bị nhiễm trùng. Bệnh do trực khuẩn *Haemophililus ducreyi*, được August Ducrey phát hiện năm 1889. Hiện nay bệnh thường gặp ở các nước nhiệt đới, kém phát triển, hiếm gặp ở các nước phát triển.

Trực khuẩn *H. ducreyi* ngắn, Gram âm, xếp thành chuỗi, ăn màu hai đầu đậm hơn, có đặc điểm chung của chi Haemophilus, mỏng manh.

Vi khuẩn chỉ nuôi cấy được trên môi trường đặc biệt, giàu dinh dưỡng và có yếu tố phát triển X và CO_2.

3.2. Khả năng gây bệnh

Sau thời gian ủ bệnh ngắn 3-5 ngày, *H. ducreyi* gây một mụn mủ, thường tại bộ phận sinh dục, sau vài ngày trở thành vết loét gọi là săng hạ cam mềm *(Soft chancre)*. Ở nam, thường tại mặt dưới dương vật. Ở nữ, thường tại âm hộ. Phân biệt với săng của giang mai: săng hạ cam mềm sưng, không cứng, gây đau đớn. Có hạch nhưng không bắt buộc, thường một bên và chỉ có một hạch. Sau đó hạch sưng to, nung mủ, tạo lỗ dò mủ, máu và tạo các săng mới. Biến chứng: đôi khi có thể dẫn đến biến chứng tạo những vết loét lớn, sâu, nhiễm trùng, gây viêm hạch...

3.3. Chẩn đoán

Bệnh phẩm lấy từ vết loét, đem xét nghiệm, nuôi cấy hoặc có thể dùng ngòi bút chủng đậu rạch da cánh tay, rồi lấy mủ tại vết loét, hạch phết lên. Sau 48 giờ, nếu mắc bệnh sẽ sưng.

3.4. Trị liệu

- Ceftriaxon 250 mg, tiêm bắp một lần duy nhất.
- Erythromycin 500 mg x 3 lần/ngày x 7 ngày. Cotrimoxazol 480 mg x 3 lần/ngày x 7 ngày. Nếu hạch đã bị viêm, cần phải rút mủ.

4. VI KHUẨN GÂY VIÊM ĐƯỜNG TIẾT NIỆU KHÔNG PHẢI LẬU CẦU

Hiện nay tại các nước phát triển, viêm đường tiết niệu do lậu cầu đã giảm nhiều trong khi đó viêm đường tiết niệu do các vi khuẩn khác lại tăng lên. Viêm đường tiết niệu không do lậu cầu (NGU: Non-Gonococcal Urethritis) là từ chung để chỉ những bệnh nhân không nhiễm lậu cầu nhưng có nhiễm trùng đường tiết niệu, thường đặc trưng bởi viêm đường tiết niệu và thường có kèm theo sự tiết mủ.

Các nguyên nhân chính của viêm niệu đạo không do lậu:

- *Chlamydia trachomatis*: 30-50% các trường hợp viêm đường tiết niệu không do lậu.
- *Ureaplasma urealyticum*: khoảng 25%.
- Các nguyên nhân khác: 25%.

4.1. *Chlamydia trachomatis*

Đặc điểm

Vi khuẩn thuộc chi Chlamydia, kích thước nhỏ 0,25 μm, ký sinh nội bào bắt buộc. Trước kia, Chlamydia cùng với Rickettsia và Mycoplasma được xếp vào nhóm trung gian "những vi sinh vật nhỏ".

Chlamydia có chu kỳ sinh sản phức tạp. Sau khi xâm nhập vào tế bào, từ thể sơ khởi, vi khuẩn bị bọc trong không bào rồi thành thể ban đầu nằm trong tế bào chất. Vi khuẩn trong thể ban đầu to lên thành thể ẩn nhập, trong đó có nhiều thể sơ khởi. Sau đó thể ẩn nhập được phóng thích do tế bào vật chủ bị vỡ và các vi khuẩn ra ngoài để tiếp tục xâm nhập các tế bào mới. Do cách sinh sản đặc biệt, chỉ có một họ Chlamydiaceae và một chi Chlamydia mà thôi.

Khả năng gây bệnh

C. trachomatis gây bệnh ở đường sinh dục, đường tiết niệu, ngoài ra còn có thể gây bệnh ở đường hô hấp và ở mắt.

- ***Ở mắt*** gây bệnh đau mắt hột (Trachome), có thể:
  + Chỉ là đau mắt hột đơn giản, gây viêm kết mạc hột, bội nhiễm hay không, đôi khi gây thành dịch.
  + Có thể là đau mắt hột phức tạp, bệnh bị bội nhiễm, có thể dẫn đến viêm loét giác mạc và mù.
- ***Ở đường hô hấp*** do Chlamydia từ mắt xuống. Triệu chứng: viêm tai, ngạt mũi, viêm khẩu hầu.
- ***Ở đường sinh dục*** trong các bệnh viêm đường tiết niệu không do lậu, *C. trachomatis* chiếm tỉ lệ cao nhất (30-50%). Ở đường sinh dục *C. trachomatis* gây bệnh hột xoài thường do typ huyết thanh A -D. Triệu chứng là một vết loét nhỏ ở cơ quan sinh dục rồi hạch cùng bên sưng to lên. Nếu không điều trị sẽ vỡ mủ, vết thương sẽ như một vòi hoa sen, bội nhiễm nhiều lần gây nghẽn đường bạch huyết, biến chứng phù chân voi. Ở nữ: viêm đường tiết niệu, cổ tử cung, vòi Eustach. Ngoài ra nhiều trường hợp viêm nhiễm do *C. trachomatis* có thể kết hợp cả với lậu cầu, do vậy điều trị với kháng sinh dùng cho lậu cầu thì thất bại.

Chẩn đoán - Trị liệu

Bệnh phẩm phải lấy sâu trong đường sinh dục hay các chất tiết từ các cơ quan khác (mắt, đờm, dịch phổi ...).

Xét nghiệm trực tiếp bằng phương pháp nhuộm *Giemsa-Machiavello:* thể sơ khởi màu tím, thể ban đầu màu xanh, thể ẩn nhập màu đậm, thể nhân tế bào màu tím sẫm. Ngoài ra có thể dùng dung dịch Lugol: thể ẩn nhập có màu nâu.

Xét nghiệm gián tiếp kháng thể bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

Nuôi cấy: trước kia nuôi cấy vào trứng gà lộn, hiện nay có thể áp dụng nuôi cấy tế bào.

Trị liệu bằng erythromycin 40 mg/kg/ngày. Doxycyclin 100 mg (1-2 viên) x 10-20 ngày.

4.2. *Ureaplasma urealyticum*

Vi khuẩn thuộc họ Mycoplasmataceae, gây bệnh viêm đường tiết niệu.

Đây là một trong những vi khuẩn có kích thước nhỏ gây bệnh trên người, kích thước chỉ khoảng 0,15 μm. Triệu chứng bệnh gây ra bởi *Ureaplasma urealyticum* khá giống bệnh do lậu cầu, nhưng chủ yếu gây tiểu khó, tiết mủ ít hơn. Ở nam giới, gây viêm đường niệu. Ở nữ giới, gây viêm âm đạo, viêm vòi trứng.

Bệnh lây nhiễm chủ yếu do quan hệ tình dục với nguồn bệnh. Một số biến chứng có thể xảy ra như ở nam, có thể bị vô sinh; ở nữ,có thể bị sẩy thai, đẻ non.

Nuôi cấy vi khuẩn phải dùng môi trường phức tạp có 20% huyết thanh, dịch chiết men, β-lactamin hay polymycin B trong điều kiện có CO_2.

Trị liệu

Cần lưu ý *Ureaplasma urealyticum* là vi khuẩn không có thành tế bào nên penicillin không tác động được.

Tetracyclin là thuốc khá hữu hiệu được lựa chọn, sau đó là macrolid, fluoroquinolon.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Phản ứng thường được dùng để tìm vi khuẩn giang mai:

a. Cố định bổ thể
b. Ngưng kết hồng cầu
c. Phản ứng lên bông
d. Bất động xoắn khuẩn
e. Miễn dịch huỳnh quang

2. Vi khuẩn giang mai giai đoạn III nguy hiểm do:

a. Có thể di truyền
b. Có khả năng lây nhiễm cao
c. Khu trú tại nhiều cơ quan
d. Gây tổn thương thần kinh, tim mạch không phục hồi
e. Không có triệu chứng điển hình

3. Bệnh giang mai lây truyền qua đường:

a. Sinh dục
b. Máu
c. Hô hấp
d. Tiêu hoá
e. a, b

4. Giang mai bẩm sinh là bệnh:

a. Truyền nhiễm

b. Di truyền

c. Tự miễn

d. Rối loạn chuyển hoá

e. b, c

5. Vi khuẩn lậu:

a. Chỉ sống ở đường sinh dục

b. Gây viêm giác mạc ở trẻ sơ sinh

c. Vaccin có hiệu quả

d. Cầu khuẩn Gram dương

e. Tất cả

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Madigan, Martinko and Parker. ***Brock Biology of Microorganisms***. 9th edition, 2000.
2. J. C. Sherris. ***Medical microorganisms***. 3rd edition, Prentice-Hall International Inc., 1994.
3. J.Freney, F. enaud, W.Hansen, C.Bollet. ***Manual de Bacterologie Clinique***. 2nd edtion, Elsevier, 1994

Bài 13

VI KHUẨN GÂY BỆNH QUA ĐƯỜNG KHÔNG KHÍ

MỤC TIÊU

1. *Khái quát được đặc điểm hình thể các vi khuẩn gây bệnh đường không khí.*
2. *Mô tả được cấu trúc tổng quát và tính chất của kháng nguyên của vi khuẩn.*
3. *Hiểu được khả năng gây bệnh và cách truyền nhiễm.*
4. *Nắm vững được nguyên tắc điều trị bệnh nhiễm do vi khuẩn gây bệnh đường không khí.*

1. BỆNH DO STREPTOCOCCI

1.1. Đặc điểm

Streptococci là một nhóm lớn, gồm nhiều loài khác nhau. Vi khuẩn Gram dương, hình cầu hoặc hình bầu dục, đường kính khoảng 1 μm xếp thành chuỗi dài hay ngắn. Một số Streptococci có khả năng gây bệnh ở người, một số là những vi khuẩn cơ hội.

Streptococci có ở khắp nơi: Đất, nước, không khí, sống cộng sinh với thú hay người (ở da và niêm mạc cuống họng).

Vi khuẩn kỵ khí hoặc kỵ khí tùy ý. Khi mới trích từ bệnh phẩm nên nuôi trong điều kiện kỵ khí và dùng môi trường phong phú (môi trường thạch máu, môi trường BHI, môi trường có huyết thanh).

Trong môi trường lỏng hay mới lấy từ bệnh phẩm, Streptococci có dạng chuỗi dài uyển chuyển. Trên môi trường rắn cho chuỗi ngắn hơn hay có dạng cặp đôi.

1.2. Phân loại

Có nhiều hệ thống phân loại Streptococci, nhưng có hai hệ thống được công nhận rộng rãi:

Phân loại theo sự tan huyết

Hệ thống phân loại này của J. H. Brown từ năm 1919 chia Streptococci làm ba nhóm dựa vào sự tan huyết trên môi trường thạch máu:

Streptococci tan huyết α (α-hemolytic streptococci): Có khả năng phá hủy một phần hồng cầu trong môi trường nuôi cấy làm cho xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn có màu xanh.

Streptococci tan huyết β (β-hemolytic streptococci): Có khả năng phá hủy hoàn toàn hồng cầu làm cho xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn có vòng trắng trong sáng.

Streptococci tan huyết γ (γ-hemolytic streptococci): Không có khả năng tác động trên hồng cầu vì vậy xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn không có sự thay đổi màu.

Phân loại theo Lancefield

Hệ thống phân loại theo Rebecca Lancefield đề nghị từ năm 1935 dựa trên sự khác nhau của thành phần carbohydrat C đặc biệt có tính kháng nguyên nằm trên thành tế bào. Theo hệ thống phân loại này, Streptococci được chia thành các nhóm ký hiệu từ A đến O (gọi là immunological groups, nhóm miễn dịch).

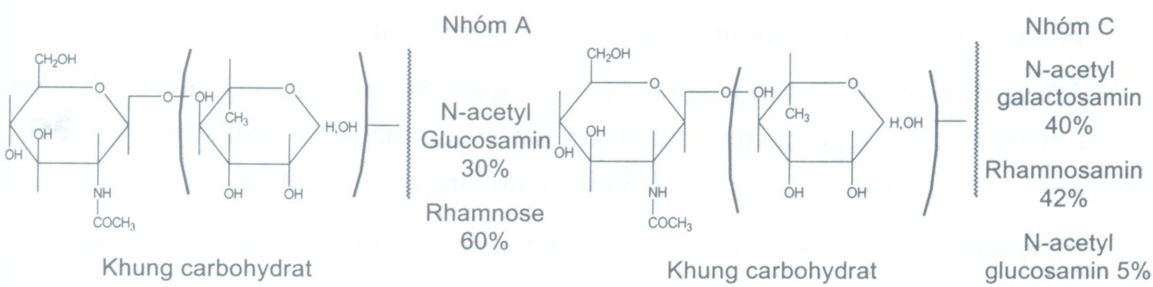
Phần lớn vi khuẩn gây bệnh ở người nằm trong nhóm A, thông thường nhất là *Streptococcus pyogenes*, có khả năng huyết giải β.

Hiện nay phân loại Streptococci dựa trên cả về hình thể, tính chất miễn dịch học và khả năng gây tan huyết.

1.3. Kháng nguyên

Carbohydrat C

Nằm trong thành tế bào vi khuẩn. Đây là cơ sở để Lancefield phân loại Streptococci thành các nhóm từ A đến O. Carbohydrat C chiếm khoảng 10% trọng lượng khô của thành tế bào và có chứa đường rhamnose và hexosamin.



Hình 13.1. Cấu trúc carbohydrat C

Protein M

Có ở vi khuẩn gây bệnh *Streptococcus pyogenes*, protein này nằm ở thành tế bào và pili giúp cho vi khuẩn bám vào sợi cơ ở yết hầu và làm chậm sự thực bào. Có hơn

60 loại protein M đã được nhận định tương ứng với 60 typ kháng thể chống lại các kháng nguyên này. Protein M có liên quan đến độc tính của vi khuẩn.

Kháng nguyên T

Có bản chất là protein, bị hủy bởi acid và nhiệt, kháng nguyên này không liên quan đến độc tính của vi khuẩn.

Kháng nguyên bề mặt

- *Kháng nguyên P:* Bản chất là nucleoprotein.
- *Acid teichoic:* Chiếm khoảng 1% trọng lượng khô của thành tế bào, có tác động như một nhóm antigen đặc biệt của nhóm D và N, không có ở nhóm khác.
- *Pyogenic:* Là một nội độc tố (endotoxin) được phát hiện ở Streptococci nhóm A.

1.4. Enzym và độc tố

Streptokinase (fibrinolysin) có khả năng huyết giải sợi huyết tố fibrin do biến plasminogen trong huyết tương thành plasmin. Plasmin có tính làm tan sợi huyết và protein.

Streptokinase có tính kháng nguyên mạnh tạo kháng thể là ASK (anti-streptokinase).

Streptodornase có tác dụng thủy phân ADN.

Hyaluronidase có tác dụng làm tan acid hyaluronic (acid tạo liên kết ở mô liên kết) giúp vi khuẩn lan tràn dễ dàng. Hyaluronidase có tính kháng nguyên và tạo kháng thể ASH (anti strepto hyaluronidase).

Hemolysin: Streptococci nhóm A có 2 loại hemolysin

Streptolysin O có tác dụng làm tan hồng cầu ở môi trường không có oxy. Có tính kháng nguyên mạnh, kích thích cơ thể thành lập kháng thể ASO (anti streptolysin O). Định lượng kháng thể này giúp chẩn đoán bệnh do Streptococci nhóm A.

Streptolysin S có khả năng làm ly giải hồng cầu, có tính kháng nguyên kém.

Độc tố gây ban đỏ (Erythrogeic toxin) có bản chất là protein gây những nốt đỏ trong bệnh tinh hồng nhiệt.

DP Nase (*diphosphopyridine nucleotidase*) có tác dụng giải phóng nicotinamid từ DPN. Enzym này có ở vài loại vi khuẩn nhóm A có tác động độc đối với bạch cầu.

1.5. Streptococci tan huyết β nhóm A

Khả năng gây bệnh

Vi khuẩn này gây nhiều bệnh nhiễm cấp tính chuyên biệt, không chuyên biệt và những biến chứng không mưng mủ gọi là bệnh nhiễm hậu Streptococcus.

Bệnh nhiễm cấp tính không chuyên biệt

Bình thường gây viêm họng, ngoài ra cũng gây nhiễm khuẩn ngoài da như chốc lở (*impetigo*) hoặc gây nhiễm khi bỏng và có vết thương, viêm âm đạo, viêm vòi tử cung (viêm nghẽn sẽ dẫn tới vô sinh), viêm tai có thể đưa đến nhiễm khuẩn huyết và viêm màng não - tủy.

Nếu lúc sinh dùng dụng cụ không được tiệt trùng có nhiễm *Streptococcus hemolyticus* sẽ gây bệnh sốt hậu sản.

Viêm màng trong tim: Trạng thái cấp tính van tim bị hủy hoại nhanh chóng đưa đến suy tim trong vài ngày, vài tuần dẫn đến tử vong. Trường hợp bán cấp thường xảy ra ở những bệnh nhân bị hỏng van tim bẩm sinh. Bệnh còn do nguyên nhân nhiễm *Viridans streptococci*, thường vi khuẩn xâm nhập sau khi nhổ răng.

Bệnh nhiễm cấp tính chuyên biệt

Viêm quầng

Bệnh bắt đầu ở những lỗ tự nhiên như lỗ mũi hay từ vết thương. Ở ngạnh mũi nguy hiểm nhất vì tạo phản ứng viêm mạnh do cơ chế nhiễm và phản ứng tăng cảm. Viêm quầng là bệnh nhiễm cấp tính chuyên biệt do Streptococci.

Bệnh tinh hồng nhiệt

Bệnh do Streptococci nhóm A có ở amidan hay cuống họng gây sưng niêm mạc và tróc vảy, phóng thích độc tố gây phản ứng tổng quát biểu hiện bởi những triệu chứng như nổi ban đỏ và sốt.

Biến chứng hậu nhiễm Streptococci

Thấp khớp cấp tính

Đây là một phản ứng miễn dịch gây tai hại ở dịch hoạt và màng trong tim. Cơ chế là streptolysin O tạo kháng thể ASO. Phức hợp kháng nguyên -kháng thể này gắn lên dịch hoạt gây viêm. Hoặc streptolysin O có epitop như ở tế bào dịch hoạt, màng tim nên kháng thể chống streptolysin O sẽ chống luôn dịch hoạt và màng trong tim gây viêm khớp và viêm màng trong tim. Bệnh thường xảy ra sau khi bị viêm họng.

Viêm cuộn tiểu cầu thận cấp tính

Bệnh thường xảy ra sau khi bị nhiễm khuẩn ngoài da. Bệnh xảy ra do phản ứng kháng nguyên - kháng thể ở cầu thận. Ở tình trạng cấp tính đi tiểu ra máu, phù, huyết áp tăng... có thể dẫn đến tử vong. Bệnh có thể trở thành mạn tính, cuối cùng gây suy thận.

Dịch tễ học

Truyền nhiễm từ người sang người do nước bọt hay nhiễm khuẩn da. Biến chứng hậu nhiễm có thể xảy ra thành dịch nhỏ, phần lớn ở trẻ em.

Chẩn đoán

Xét nghiệm trực tiếp: Lấy bệnh phẩm từ nơi nhiễm, trải trên lam kính, nhuộm và quan sát với kính hiển vi thấy vi khuẩn xếp thành chuỗi, hoặc lấy bệnh phẩm phân lập trên thạch máu, tìm khóm nhỏ huyết giải β.

Xét nghiệm gián tiếp: Định lượng ASO, bình thường có hàm lượng 200 μg/ml, nếu có bệnh tăng lên 800 μg/ml.

Có thể định lượng ASK hay ASH.

Trị liệu

Hóa dự phòng: Áp dụng bệnh nhân bị biến chứng để phòng ngừa tái phát. Dùng penicillin chậm hay erythromycin. Dự phòng có thể kéo dài nhiều năm hay suốt đời.

Điều trị với penicillin G là tốt nhất, nếu có dị ứng dùng erythromycin.

1.6. Streptococci nhóm B

Gây bệnh ở cơ quan sinh dục hay đường tiết niệu. Điều trị bằng penicillin G nhưng yếu, nên phối hợp penicillin G với gentamicin.

1.7. Streptococci tan huyết α *(Viridans streptococci)*

Gồm *S. salivarius*, *S. mitis*, *S.mutans*. Cho tan huyết không tan trong mật và không bị ngăn chặn bởi optochin.

Nhóm này có trong đường hô hấp, nhất là ở miệng. Nếu ở miệng có tổn thương (nhổ răng), chúng vào máu gây viêm màng trong tim nếu van tim không bình thường. Nhóm *Viridans streptococci* không nhạy lắm với penicillin, phải phối hợp với kháng sinh khác.

1.8. Streptococci không tan huyết (Streptococci nhóm D)

Gồm *S. faecalis*, *S. faecium*, nằm trong nhóm Enterococcus. Cộng sinh ở ống tiêu hóa của người và thú, nuôi được ở môi trường thường. Sống được ngoài cơ thể. Sự hiện diện của chúng trong nước có thể chứng minh nước bị nhiễm phân.

Đặc điểm: Chịu được 40% mật và tác động của natri azid.

Đây là vi khuẩn cơ hội gây nhiễm đường tiết niệu, nhiễm sưng mủ, có thể do sử dụng dụng cụ khám đường tiết niệu hay đường tiêu hóa không tiệt trùng đúng mức.

Điều trị: Kháng tự nhiên với nhiều kháng sinh, nên thử tính nhạy cảm in vitro để tìm phối hợp.

2. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

2.1. Đặc điểm hình thể

M. tuberculosis gây bệnh lao được Robert Koch tìm ra năm 1882 mặc dù bệnh lao đã được mô tả từ nhiều thế kỷ trước.

Trực khuẩn lao (Tubercle Bacillus) được xem như một dạng chuyển tiếp giữa Eubacteria và xạ khuẩn (*Actinomyces*). Tế bào vi khuẩn dài 2-4 μm, ngang 0,2-0,5 μm, đôi khi phân nhánh hay có dạng sợi. Vi khuẩn không di động, không sinh bào tử, dễ kết nùi trong môi trường lỏng. Tế bào vi khuẩn chứa nhiều hạt, khi nhuộm sẽ bắt màu đậm hơn. Vi khuẩn lao đề kháng được với nhiều tác nhân vật lý và hóa học như khô, chất tẩy, acid, base. Vi khuẩn lao rất khó bắt màu thuốc nhuộm thông thường. Cần nhuộm vi khuẩn với các tác nhân nhuộm màu mạnh như carbol fuschin nóng và tăng thời gian tiếp xúc.

2.2. Đặc điểm tăng trưởng và nuôi cấy

Vi khuẩn lao tăng trưởng rất chậm (2-3 tuần) do có thời gian thế hệ dài từ 15-22 giờ. Vì vậy việc nuôi cấy để nhận định vi khuẩn cần nhiều thời gian.

Để nuôi cấy vi khuẩn có thể sử dụng nhiều loại môi trường: môi trường thường và các môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh kháng vi khuẩn và vi nấm. Có thể dùng môi trường lỏng như môi trường Dubos, hoặc các môi trường rắn, môi trường này dùng để phân lập, nuôi cấy và giữ chủng. Sau 2-4 tuần cho những khóm như bông cải màu vàng nhạt.

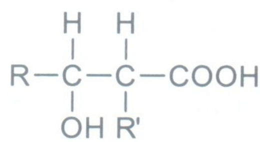
2.3. Đặc điểm cấu trúc

Điều đáng chú ý nhất trong thành phần hóa học của Mycobacteria là tỷ lệ cao bất thường của lipid từ 20-40% trọng lượng khô với thành phần lipid ở thành tế bào đạt tới 60%. Điều này giải thích đặc tính không thấm nước của thành tế bào vi khuẩn và xu hướng kết dính nhau trong quá trình phát triển ở môi trường lỏng và sự nổi trên bề mặt trừ khi được phân tán bằng chất diện hoạt.

Thành tế bào chứa nhiều lipid còn là cơ sở giải thích một vài tính chất bất thường của Mycobacteria như khó bắt màu trong quá trình nhuộm, kháng acid, base và đề kháng với tác động diệt khuẩn của kháng thể và bổ thể.

Lipid

Lipid của Mycobacteria gồm có phospholipid, glycolipid (còn gọi là mycosid) và sáp. Trong các acid béo của lipid đã được tìm thấy có acid mycolic là một trong các yếu tố đóng vai trò quan trọng trong sự kháng acid của vi khuẩn lao.



Acid mycolic

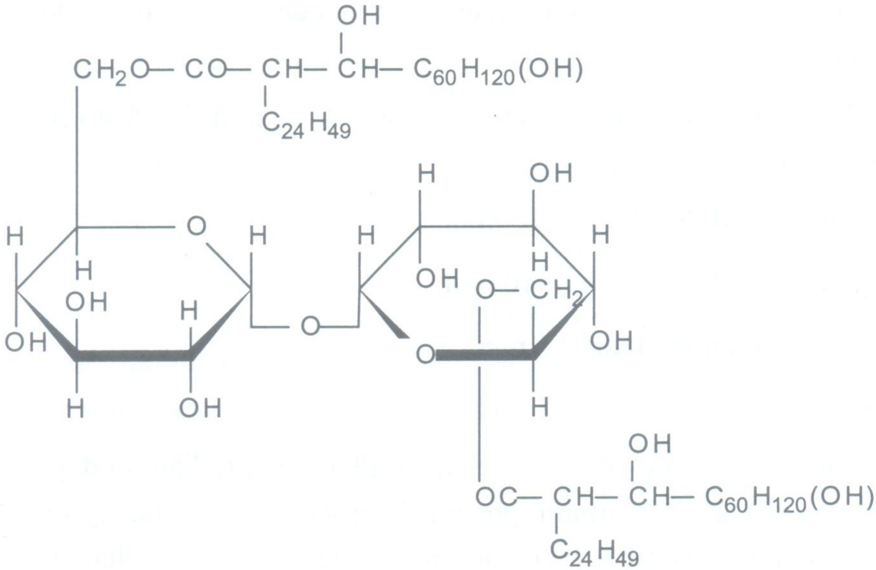
Mycobacteria gây bệnh ở người và bò có $R' = C_{24}H_{49}$.

Loại gây bệnh ở chim và hoại sinh có $R' = C_{22}H_{45}$.

R chứa khoảng 60 C và 1-2 phân tử oxy, số lượng thay đổi tùy theo loài Mycobacteria.

Yếu tố tạo xoắn (Cord factor)

Đây là một yếu tố làm vi khuẩn xoắn vào nhau (tạo thừng). Yếu tố này có liên quan đến độc tính của Mycobacteria do có khả năng ức chế sự di chuyển của bạch bào đa nhân *in vitro*, liều 10 μg có thể giết chết chuột bằng đường tiêm dưới da. Tách yếu tố tạo xoắn sẽ làm vi khuẩn không độc. Khi tế bào vi khuẩn Mycobacteria còn trẻ có độc tính cao hơn tế bào vi khuẩn già do tế bào trẻ chứa nhiều yếu tố tạo xoắn hơn.



6,6'-Dimycolyltrehalose (Cord Factor)

Hình 13.2. Cấu trúc yếu tố tạo xoắn

Protein

Tế bào Mycobacteria có nhiều protein, khi tiêm protein này sẽ cho phản ứng quá mẫn. Phương pháp tiêm protein từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn gây phản ứng quá mẫn gọi là phản ứng tuberculin đã được Charles Mantoux áp dụng từ năm 1910 để phát hiện bệnh lao.

Hiện nay người ta dùng protein tinh khiết chiết từ vi khuẩn lao gọi là PPD (Purified Protein Derivative).

2.4. Phản ứng quá mẫn và miễn dịch

Hiện tượng Koch

Tiêm vi khuẩn độc vào chuột lang bình thường, sau 10-14 ngày nơi tiêm nổi một cục, sau một thời gian chuột lang chết.

Đối với chuột lang đã bị nhiễm, tiêm lần hai ở vị trí khác, sau 24-48 giờ nơi tiêm bị viêm, lở, rồi lành nhanh một cách tự nhiên. Phản ứng trước (viêm lở) là hiện tượng quá mẫn chậm của chuột lang đã nhạy cảm, hiện tượng lành là do miễn dịch thụ nhận.

Phản ứng tuberculin

Đây là phản ứng quá mẫn gây viêm tại chỗ. Chứng minh bằng cách tiêm tuberculin thế cho vi khuẩn lao sống. Phản ứng âm tính nghĩa là cơ thể chưa tiếp xúc với vi khuẩn lao và ngược lại. Phản ứng này còn được dùng để kiểm soát hiệu quả tiêm chủng.

Thực hiện bằng cách tiêm PPD trong da hay cà trên da và đo đường kính vết sưng đỏ sau 48 giờ.

- Phản ứng (+): đường kính > 10 mm.
- Phản ứng (±): đường kính 5 -10 mm.
- Phản ứng (-): đường kính < 5 mm.

Miễn dịch

Sự nhiễm khuẩn trong bệnh lao là nhiễm khuẩn nội tế bào. Ở đây mặc dù có sự thành lập kháng thể như agglutinin, precipitin, opsonin… (các kháng thể có tác dụng trung hòa độc tố, hoạt hóa các tế bào thực bào) nhưng không có tác dụng bảo vệ cơ thể.

Khi vi khuẩn xâm nhập cơ thể, hệ thống miễn dịch tế bào được kích động với sự sinh sản của các tế bào lympho và hiện tượng hoạt hóa đại thực bào. Các đại thực bào được hoạt hóa sẽ làm tăng các enzym ly giải và các yếu tố tiêu diệt vi khuẩn khác để loại trừ các vi khuẩn sống.

Trong miễn dịch chủ động thường dùng vaccin BCG (*Bacilli de Calmette Guerine*).

2.5. Khả năng gây bệnh và sinh lý bệnh

Trong nguyên nhân dẫn đến mắc bệnh lao, sự giảm sút sức đề kháng của cơ thể là một nguyên nhân quan trọng. Một người có thể nhiễm lao (có phản ứng với tuberculin khi tiêm dưới da) nhưng không bị bệnh lao. Nhưng nếu cơ thể bị suy giảm miễn dịch do một số yếu tố như suy nhược cơ thể do suy dinh dưỡng, lao động cực nhọc, bệnh đái tháo đường, hút thuốc, bụi phổi ... từ sơ nhiễm có thể trở thành mắc bệnh lao.

Ở giai đoạn sơ nhiễm

M. tuberculosis được hít vào phổi do những hạt bụi, hạt nước nhỏ ... sẽ vào phế nang. Vi khuẩn sẽ sinh sản trong đại thực bào. Các đại thực bào và các lympho T sẽ được hệ thống miễn dịch đưa tới vị trí này. Các đại thực bào liên kết với nhau, thành của tế bào bị calci hóa và có những sợi bao quanh tế bào khổng lồ có vi khuẩn, đây là nang.

Tiến triển của bệnh nhiễm

Khi cơ thể suy nhược hoặc dưới tác động của các yếu tố bất lợi, vết thương phát triển tạo hang có mủ độc hay còn gọi là bã đậu (*caseum*).

Hang có thể bị xơ cứng và nhốt vi khuẩn trong đó (lao xơ hay mạn tính). Trường hợp xấu nang trở nên mềm, bã đậu được thải ra ngoài qua cuống phổi. Đây là nguồn lây nhiễm nguy hiểm.

Trong trường hợp cá biệt nang có thể phát triển xa, vi khuẩn lan tới những cơ quan khác như xương, gan, thận, não, tạo dạng lao kê. Dạng này rất nguy hiểm gây tỷ lệ tử vong cao, có thể chết trong vài tháng.

Ngoài phổi, vi khuẩn lao còn có thể khu trú tại nhiều tạng, cơ quan và gây bệnh như lao màng não, lao màng bụng, lao màng tim, lao hạch, lao xương, khớp, lao sinh dục-tiết niệu, lao ruột, thanh quản, da ... trong đó lao màng não nguy hiểm dễ gây tử vong hoặc lao xương, khớp để lại di chứng nặng nề.

2.6. Dịch tễ học

Người là tác nhân mang mầm bệnh. Bệnh nhân có vết thương ở phổi chứa *M. tuberculosis* truyền nhiễm bằng những giọt nước bọt nhỏ khi ho, có khi do tay, vật dụng hay qua đường tiêu hóa.

2.7. Chẩn đoán

Lấy bệnh phẩm

Trong bệnh lao phổi, lấy đờm vào buổi sáng khi thức dậy. Nếu bệnh nhân không khạc được thì lấy chất nhờn từ cuống phổi do nuốt vào dạ dày bằng ống. Nếu nhiễm màng não thì lấy dịch não tủy.

Xét nghiệm vi khuẩn học

– Nếu là đờm sẽ thuần nhất bằng NaOH nóng sẽ diệt các vi khuẩn khác, đem ly tâm lấy cặn, cấy trên môi trường Loeffler hay khảo sát trực tiếp. Nhuộm màu bằng phương pháp Ziehl -Neelsen hay phương pháp Kinioun. Nếu thấy vi khuẩn thì chắc chắn bị lao.

– Nếu lấy từ dịch não tủy, cấy vào môi trường. Nếu không tìm thấy vi khuẩn có thể sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử PCR. Phương pháp này được áp dụng trong thời gian gần đây dựa trên sự phóng đại một đoạn gen đặc hiệu của *M. tuberculosis* là IS 6110 bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction). Sau đó nhận định bằng sắc ký điện di và so sánh với mẫu dương tính chuẩn. Phương pháp này cho độ nhạy rất cao, có thể phát hiện được chỉ cần với một vi khuẩn lao trong bệnh phẩm. Thường áp dụng phát hiện vi khuẩn lao trong bệnh phẩm chứa ít vi khuẩn (khi khảo sát bằng phương pháp khác cho kết quả không rõ hay những bệnh phẩm khó phát hiện như dịch não tủy).

Việc nhận định vi khuẩn lao bằng các phương pháp trên cần chú ý phân biệt *M. tuberculosis* và *M. smegmatis* là vi khuẩn hoại sinh ở đường tiết niệu bằng cách tiêm vi khuẩn vào thú thử nghiệm. Nếu là vi khuẩn độc, chuột sẽ chết hoặc nếu lượng vi khuẩn ít thì thú chưa chết có thể giải phẫu thấy hạch lympho lớn, thâm nhiễm. Hoặc kết hợp với các triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân, kết quả chụp X quang.

2.8. Phòng ngừa - Trị liệu

Tiêm chủng bằng BCG cho những người chưa tiếp xúc vi khuẩn, nhất là trẻ sơ sinh.

Dùng phối hợp kháng sinh rifampicin, INH, ethambutol hay streptomycin, PZA.

Thời gian điều trị kéo dài 6-9 tháng hay một năm tùy trường hợp. Nên dùng phối hợp ba kháng sinh để tránh đề kháng và phải đánh giá sự dùng kháng sinh. Có thể chia giai đoạn tấn công thì dùng hàng ngày và giai đoạn duy trì dùng thuốc cách ngày.

3. VI KHUẨN GÂY BỆNH BẠCH HẦU: *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE*

3.1. Đặc điểm

Vi khuẩn Gram dương, hình que dài 2-6 μm, ngang 0,5-1 μm, có thể có dạng quả tạ (hai đầu phình ra), hình chùy hoặc dạng thẳng nhưng không đều. Xếp từng đám, hình hàng rào, chữ V, không có bào tử. Hình dạng của Corynerbacteria giống với xạ khuẩn hơn là giống với Eubacteria.

Khi nhuộm với xanh methylen, chúng bắt màu không đều và có những chỗ bắt màu đậm hơn trông giống một chuỗi. Đôi khi thấy rõ sự nhuộm màu phân cực. Những đặc điểm trên là do vi khuẩn có chứa những hạt có bản chất là polyphosphat.

Mặc dù đặc điểm hình dạng có ở phần lớn vi khuẩn giống *C. diphtheriae* nhưng không thể là đặc điểm để nhận định loài.

Corynerbacteria diphtheriae là loài thường gây bệnh ở người do có khả năng sản xuất nội độc tố.

Hai loài không gây bệnh là *C. hofmannii* và *C. xerosis* sống hội sinh ở người. Chúng phát triển trên thạch tellurit và dễ nhầm lẫn với *C. diphtheriae*. Cả hai loài đều không sản xuất độc tố và có thể phân biệt với *C. diphtheriae* nhờ phản ứng lên men.

3.2. Nuôi dưỡng

C. diphtheriae phát triển tốt trong canh thang thịt bò, trên thạch máu, thạch máu tellurit và trên môi trường Loeffler có huyết thanh.

Môi trường Loeffler thường được sử dụng đầu tiên để ly trích vi khuẩn vì *C. diphtheriae* phát triển nhanh hơn những loài khác có trong đường hô hấp. Thạch máu tellurit ức chế sự phát triển của ,các vi khuẩn khác, đây là môi trường chọn lọc *C. diphtheriae*. *C. diptheriae* cho những khuẩn lạc đen, tuy nhiên một số vi khuẩn khác ở đường hô hấp và những Corynebacteria không gây bệnh cũng có thể cho những khuẩn lạc đen trên thạch tellurit.

Trên môi trường phân lập có thể có hai loại khuẩn lạc: loại khuẩn lạc Gravis là khuẩn lạc nhăn và loại khuẩn lạc Mitis là khuẩn lạc trơn. Ở hai loại khuẩn lạc này độc tính tùy thuộc và khả năng sản xuất độc tố.

Ngoài ra còn có loại Intermedius là khuẩn lạc trung gian, cho dạng khuẩn lạc nhỏ hơn, có thể gồm cả loại trơn và nhăn.

C. diphteriae có thể lên men một số loại đường nhưng không tạo gas. Một số chủng cũng có khả năng lên men saccharose và tinh bột.

3.3. Khả năng gây bệnh

C. diphtheriae có khả năng gây bệnh cao đối với người và gây nhiễm độc do ngoại độc tố protein rất mạnh, tuy nhiên vi khuẩn chỉ cố định tại yết hầu. Vi khuẩn tạo màng giả chung quanh amidan, phát triển ra vòm miệng rồi cuống họng và gây viêm hạch. Viêm thanh quản do bạch hầu thường là nặng gây tử vong do ngạt thở hay do độc tố phân tán vào máu rồi đến cố định vào nhiều tế bào thận, gan, thần kinh ...

3.4. Dịch tễ học

Truyền nhiễm từ người này sang người khác bằng không khí từ dạng viêm thanh quản hay dạng nhiễm không biểu lộ. Hiện nay nhờ tiêm chủng nên rất ít dịch.

Ngoại độc tố có tính miễn dịch mạnh. Vaccin là toxoid có thể tạo kháng độc tố.

3.5. Chẩn đoán

Xét nghiệm trực tiếp

Lấy bệnh phẩm bằng que ngoáy xung quanh màng giả ở amidan, trải trên lam và nhuộm bằng xanh methylen. Tìm hình dạng đặc trưng của *C. diphteriae*, nhưng chỉ có tính chất chỉ dẫn vì có nhiều Corynerbacteria cộng sinh. Muốn khẳng định là Corynerbacteria độc phải chứng minh có sản xuất độc tố bằng phương pháp khuếch tán *in vitro* hay *in vivo* trên chuột.

Có thể khảo sát hình dạng khuẩn lạc và vi khuẩn bằng cách nuôi cấy trên môi trường Loffler, thạch máu tellurit.

Xét nghiệm gián tiếp

Tiêm nước canh cấy vi khuẩn vào 2 con chuột lang: 1 chuột lang được bảo vệ bởi 250 đơn vị kháng độc tố bạch hầu, 1 chuột lang không được bảo vệ. Chuột lang được bảo vệ sẽ sống và con kia sẽ chết.

Thử nghiệm *in vitro* bằng phương pháp khuếch tán trong bản thạch: trong hộp petri có chứa thạch maltoselactat và 20% huyết thanh ngựa, đặt một miếng giấy lọc chứa kháng độc tố *C. diphteriae*. Sau khi môi trường đặc lại, cấy vi khuẩn vuông góc với băng giấy tẩm kháng độc tố, ủ 24 giờ. Nếu vi khuẩn sản xuất độc tố sẽ có kết tủa.

3.6. Phòng ngừa - Trị liệu

Vaccin ngừa bạch hầu là giải độc tố bạch hầu, thường phối hợp với vaccin ngừa uốn ván, ho gà.

- Dùng huyết thanh kháng độc tố bạch hầu SAD (Serum Anti Diphterique).
- Dùng kháng sinh diệt vi khuẩn: penicillin là tốt nhất, nếu dị ứng dùng erythromycin, amoxicillin, clindamycin.

4. NÃO CẦU KHUẨN: *Neisseria meningitidis*

4.1. Đặc điểm

- Như lậu cầu, não cầu khuẩn là tác nhân gây bệnh chỉ ở người.
- Là loại vi khuẩn yếu.
- Có ở mũi, hầu.

Vi khuẩn không sinh bào tử, không di động. Sắp xếp song cầu, đối mặt nhau bởi mặt bằng, đôi khi xếp dạng bốn vi khuẩn hoặc tụ lại.

Vi khuẩn Neisseria gây bệnh chỉ mọc trên môi trường phong phú trong khi Neisseria cộng sinh mọc trên môi trường thường. Có thể dùng các môi trường phong phú như Mueller -Hinton, chocolat, thạch máu.

Năng lực phát triển yếu, vi khuẩn nhạy cảm với những acid béo, ion kim loại. Nếu trong môi trường nuôi cấy thêm máu, tinh bột sẽ ức chế tác dụng này.

Không sống được ở nhiệt độ phòng, cần phải ủ bệnh phẩm ngay ở 37°C. Vi khuẩn phát triển tốt nếu ủ ở điều kiện có 5-10% CO_2.

Có thể thêm một số yếu tố tăng trưởng cho vi khuẩn vào môi trường như: arginin, uracil.

Khuẩn lạc vi khuẩn nhỏ, tròn, trong mờ, đường kính khoảng 1 mm. Các khuẩn lạc Neisseria có thể được nhận biết nhờ khả năng oxy hóa nhanh chóng dimethyl hoặc tetramethyl-paraphenylen diamin. Khuẩn lạc vi khuẩn trở nên đen do phản ứng oxy hóa (nhưng không phân biệt được vi khuẩn gây bệnh và không gây bệnh).

4.2. Kháng nguyên

- Kháng nguyên tế bào có bản chất là nucleoprotein gọi là kháng nguyên P, và kháng nguyên là carbohydrat.
- Kháng nguyên của nang có bản chất là polysaccharid: kháng nguyên A, B, C và D.
- Kháng nguyên của lớp màng: lipopolysaccharid (LPS).

4.3. Khả năng gây bệnh

- Chỉ gây bệnh ở người.
- Xâm nhập qua mũi, hầu và nhiễm người khác bằng đường không khí.
- Từ tiêu điểm mũi, hầu, não cầu phân tán vào máu và đến nhiễm màng não tủy, đôi khi phóng thích nội độc tố do tiêu giải cầu khuẩn tạo ban đỏ.
- Nhiễm do não cầu: viêm mũi hầu tạo hai dạng lâm sàng:
  + Viêm màng não tủy: biến chứng của sự phân tán não cầu vào máu.
  + Dạng nhiễm khuẩn huyết: nặng, sốt cao, ban đỏ và đôi khi tạo sốc.

4.4. Dịch tễ học

Vi khuẩn có thể được truyền nhiễm lẫn nhau trong một nhóm người và có ở mũi nhưng viêm màng não tủy hay nhiễm khuẩn huyết ít khi xảy ra.

Viêm màng não tủy xảy ra lẻ tẻ ở châu Âu do não cầu nhóm B. Ở châu Phi và Nam Mỹ xảy ra dạng dịch gây nhiều tử vong. Não cầu đề kháng nhiều sulfamid và kháng sinh. Đã có vaccin nhóm A, C (nhóm B chưa có).

4.5. Chẩn đoán

Lấy bệnh phẩm

Não cầu khuẩn yếu, không sống được ở nhiệt độ dưới 30°C.

Dụng cụ cần được ủ trước khi lấy, sau khi lấy ủ ngay ở 37°C (ống đựng dịch não tủy cầm trong tay).

Khảo sát

Dịch não tủy đục, có nhiều bạch cầu và bạch cầu đa nhân khó thấy não cầu nên phải ly tâm rồi khảo sát cặn. Nếu không có vi khuẩn đem ủ qua đêm ở 37°C rồi khảo sát lại.

Phản ứng huyết thanh học: phản ứng ngưng kết với huyết thanh kháng. Đây là xét nghiệm cần cho kết quả ngay.

4.6. Phòng ngừa - Trị liệu

Phòng ngừa

- Hóa dự phòng dùng macrolid như spiramycin.
- Vaccin là những đoạn polysaccharid nhóm A, C rất hiệu quả. Nhóm B đang nghiên cứu.

Trị liệu

- Nếu điều trị sớm có hiệu quả. Phải dùng kháng sinh xuyên qua được màng não tủy như các cephalosporin thế hệ thứ 3.
- Viêm màng não tủy ngoài não cầu còn có thể do amíp, Pneumococci nên phải xác định rõ vi khuẩn gây bệnh.

5. PHẾ CẦU KHUẨN: *Streptococcus pneumoniae*

5.1. Đặc điểm

Phế cầu khuẩn (Pneumococci) là vi khuẩn Gram dương sống trong họng người, có thể gây viêm phổi, viêm xoang, viêm họng…

Vi khuẩn thường xếp dạng cặp đôi, có nang, đôi khi xếp dạng chuỗi ngắn khi nuôi trong môi trường lỏng.

Nang của Pneumococci cấu tạo bởi polysaccharid và có tính kháng nguyên.

Pneumococci dễ bị phân hủy bởi những chất hoạt động bề mặt như muối mật.

5.2. Nuôi cấy

Pneumococci có năng lực yếu, không sống được trong thiên nhiên, cần môi trường phong phú nuôi cấy. Có thể dùng các môi trường: Brain Heart Infusion (BHI), thạch máu, thạch chocolat... Trên môi trường thạch máu cho huyết giải α, trên thạch chocolat cho huyết giải màu vàng.

Trên môi trường nuôi cấy rắn cho những khuẩn lạc tròn, khi vi khuẩn có nang cho những khuẩn lạc dạng S (Smooth) đường kính khoảng 0,5-1 mm (có thể đến 3 mm do có những nang lớn) sau khi ủ 24-36 giờ. Khi vi khuẩn mất nang sẽ mất độc tính và cho khuẩn lạc dạng R (Rough).

Vi khuẩn hiếu khí nhưng tăng trưởng tốt trong điều kiện có 10% CO_2 ở 37°C.

5.3. Kháng nguyên

Kháng nguyên nang

Nang cấu tạo bởi polysaccharid có tính chuyên biệt. Nhờ kháng nguyên nang có thể chia Pneumococci thành 85 typ huyết thanh.

Kháng nguyên nang gây miễn dịch chủ động và kháng thể có tính bảo vệ cao nên có thể dùng kháng nguyên làm vaccin.

Kháng nguyên thân

Protein M: tương tự như kháng nguyên M của Streptococci tuy nhiên không có ý nghĩa chống lại bệnh. Kháng thể được thành lập không có tác dụng bảo vệ như kháng thể của Streptococci.

Carbohydrat C có tính chuyên biệt cho loài. Đây là kháng nguyên của thành tế bào. Thành phần gồm bốn acid amin: lysin, serin, a. glutamic và alanin và bốn đường D-glucosamin, D-galactosamin, a. muramic và muramic acid phosphat.

Chất C có thể kết tủa với β-globulin của huyết thanh (C-reactive protein), β-globulin này tăng nhiều trong hội chứng viêm nên dùng để đo hội chứng viêm.

5.4. Khả năng gây bệnh

Nhờ có nang, phế cầu khuẩn thoát khỏi sự thực bào và sinh sản nhanh tạo phản ứng viêm với nhiều bạch cầu đa nhân và sợi huyết. Sự hiện diện của sợi huyết cho thấy tính chất trầm trọng của viêm màng phổi, nhất là viêm ở màng não tủy vì fibrin ngăn chặn sự khuếch tán của kháng sinh và sự lưu chuyển của dịch não tủy.

Từ tiêu điểm nhiễm khuẩn ở tai mũi họng, vi khuẩn phân tán vào tĩnh mạch và mạch bạch huyết, có thể gây viêm màng não tủy.

Phế cầu khuẩn gây bệnh ở đường hô hấp dưới (viêm phổi, phế quản, viêm phổi thùy và viêm màng phổi). Ngoài ra gây viêm tai-mũi-họng, xoang, tai, viêm màng não tủy.

5.5. Dịch tễ học

Mặc dù là vi khuẩn gây bệnh chuyên biệt nhưng chúng là vi khuẩn sống trong họng nên có thể gọi là vi khuẩn gây bệnh cơ hội (40-70% người khỏe có mang Pneumococci độc nhưng không gây bệnh do niêm mạc có khả năng đề kháng cao). Bệnh không gây dịch, thường là tự nhiễm vì vi khuẩn cộng sinh, xảy ra vào mùa lạnh. Trẻ em, người già, những người mắc bệnh viêm mạn tính như xơ gan, ung thư, suy giảm miễn dịch dễ nhiễm bệnh bởi phế cầu khuẩn (phải tiêm chủng).

5.6. Chẩn đoán

Khảo sát bệnh phẩm (đờm, mủ, máu, nước não tủy...) nhuộm Gram tìm vi khuẩn có dạng cặp đôi, hình ngọn nến, có nang. Đường xâm nhập, cùng với tỷ lệ vi khuẩn so với các vi khuẩn khác và ái lực với mô là những yếu tố quan trọng.

Nuôi cấy trên môi trường thạch máu, thạch chocolat và làm các thử nghiệm:

– Tan bởi muối mật: vi khuẩn tan bởi muối mật.

– Tính nhạy cảm với optochin: vi khuẩn nhạy cảm với optochin.

– Lên men đường Inulin: phản ứng dương tính.

– Thử nghiệm độc tính ở chuột: vi khuẩn có độc tính trên chuột.

5.7.Trị liệu

– Bệnh do phế cầu khuẩn thường gây tử vong ở vùng khí hậu lạnh nên phải tiêm chủng.

– Nhạy với penicillin G và nhiều kháng sinh khác như macrolid, chloramphenicol.

– Đề kháng với sulfamid và tetracyclin.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Vi khuẩn bạch hầu là:

a. Trực khuẩn Gram (-)

b. Trực khuẩn Gram (+)

c. Trực khuẩn có bào tử

d. Vi khuẩn đa hình

e. b, d

2. Đường xâm nhập vi khuẩn bạch hầu:

a. Da

b. Niêm mạc sinh dục

c. Kết mạc mắt

d. Hô hấp trên

e. Máu

3. Thành phần carbohydrat C của Streptococcus có trong:

a. Thành tế bào

b. Màng tế bào

c. Thể nhân

d. Tế bào chất

e. Nang

4. Đặc điểm của vi khuẩn lao:

a. Mọc nhanh trên môi trường thạch máu

b. Tiết nội độc tố

c. Tiết ngoại độc tố

d. Tốc độ tăng trưởng chậm

e. Nhạy với erythromycin

5. Thành phần chiếm 40% trọng lượng vi khuẩn lao:

a. Acid teichoic

b. Polysaccharid

c. Peptidoglycan

d. Lipid

e. Protein

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Madigan, Martinko and Parker. ***Brock Biology of Microorganisms***. 9th edition, 2000.
2. J. C. Sherris. ***Medical Microorganisms***. 3rd edition, Prentice-Hall International Inc., 1994.
3. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet. ***Manual de Bacterologie Clinique***. 2nd edtion, Elsevier, 1994

Bài 14

VI KHUẨN GÂY BỆNH NGOÀI DA

MỤC TIÊU

1. *Có thể ly trích, nuôi cấy được các vi sinh vật gây bệnh.*
2. *Mô tả được cấu trúc tổng quát và tính chất của kháng nguyên của vi khuẩn.*
3. *Nêu được khả năng gây bệnh và cách truyền nhiễm.*
4. *Nắm được nguyên tắc điều trị bệnh nhiễm do vi sinh vật.*

1. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1.1. Đặc điểm

Vi khuẩn sống cộng sinh trên da, mũi họng của người. Thông thường chúng không nguy hiểm, nhưng có thể gây bệnh khi vượt qua hàng rào bảo vệ của da hoặc lớp màng nhày, đó là khi lớp da bị tổn thương, đau tai, nhổ răng ...

Staphylococcus aureus là loại vi khuẩn có sức chịu đựng lớn nhất trong nhóm vi khuẩn Gram dương.

Vi khuẩn không sinh bào tử, có khả năng đề kháng với nhiệt độ, có thể chịu được nhiệt độ 60°C trong 30 phút, không chịu được tác động của vài loại phẩm màu nhuộm vi khuẩn như tím gentian, đề kháng tốt hơn những vi khuẩn khác với những chất tẩy trùng như phenol, clorid thủy ngân, chịu được tác động của áp suất thẩm thấu.

Khả năng sản xuất enzym catalase là một đặc điểm để phân biệt với Streptococci. Vi khuẩn còn có khả năng tiết ra β-lactamase nên đề kháng được các β-lactamin.

1.2. Hình thái và nuôi cấy

Cầu khuẩn Gram dương, đường kính 0,7-1,2 μm (những Staphylococci gây bệnh thường nhỏ hơn so với loại không gây bệnh), sắp xếp dạng chùm nho là đặc trưng cho *Staphylococcus aureus*, ngoài ra có thể xếp chuỗi ngắn, cặp đôi tùy môi trường nuôi cấy rắn hay lỏng.

Nuôi cấy ở 20-24°C trong môi trường giàu chất dinh dưỡng có thể cho những khuẩn lạc vi khuẩn màu vàng (do sản xuất hai loại sắc tố carotenoid: δ-carotenoid và rubixanthen). Đường kính khuẩn lạc khoảng 1-2 mm, khuẩn lạc lồi cao, tròn. Trên thạch máu có thể cho huyết giải β hoặc γ.

1.3. Kháng nguyên

- Polysaccharid A và B là hai kháng nguyên của tế bào giúp phân biệt *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcccus albus* bằng phản ứng miễn dịch học.
- Polysaccharid A được sản xuất bởi *Staphylococcus aureus* và polysaccharid B được sản xuất bởi *Staphylococcus albus* (không gây bệnh).
- Acid teichoic có tính kháng nguyên.
- Kháng nguyên của nang: Chỉ có ở một số chủng *Staphylococcus aureus* sản xuất mucoid, kháng nguyên chứa khoảng 70% carbohydrat (trong đó khoảng 1/3 là glucosamin), có thể chống lại sự thực bào.

1.4. Độc tố và enzym

Độc tố

- *Staphylosin:* Ngoại độc tố gây hoại tử mô. Là một hemolysin α, β, γ, có ở những chủng vi khuẩn gây bệnh. Vết thương bị loét do tác dụng của độc tố loại này.
- *Leucocidin* Diệt bạch cầu đa nhân.
- *Exfoliatin:* Là ngoại độc tố gây tróc mảng da, có tính hướng da, tạo những vết bỏng. Bệnh thường xảy ra ở trẻ em.
- *Enterotoxin:* Ngoại độc tố gây ngộ độc do thức ăn hay viêm ruột cấp tính, chỉ có ở vài chủng. Gây tiêu chảy vài ngày rồi hết.
- Độc tố gây hội chứng sốc.

Enzym

- *Coagulase:* Quan trọng nhất. Làm đông đặc huyết tương, đây là một đặc điểm của tụ cầu gây bệnh (coagulase (+) là gây bệnh). Enzym làm đông đặc fibrin, tạo ra một vách che chở vi khuẩn nằm giữa, dùng chymotrypsin và tetracyclin thủy phân chất này.
- *Fibrinolysin:* Cũng có ở những chủng gây bệnh, enzym này thủy phân fibrin làm tan cục máu đông thành những cục nhỏ làm nghẽn mạch.

- *Hyaluronidase:* Là enzym thủy phân acid hyaluronic, chất ciment của mô liên kết, giúp vi khuẩn khuếch tán (chất này còn được sử dụng cho những người không tiêm tĩnh mạch được nhưng muốn thuốc thấm nhanh: phối hợp thuốc và hyaluronidase).
- *β-lactamase:* Được sản xuất bởi những chủng đề kháng.

1.5. Khả năng gây bệnh

Staphylococcus aureus gây vết thương mưng mủ và hoại tử mô, có thể đưa đến vết thương ở tĩnh mạch và đặc biệt là những khối huyết nhiễm khuẩn có thể dẫn đến viêm màng trong tim, viêm phổi viêm màng não, viêm tủy.

Vết thương trên da, dưới da, niêm mạc

Trên da gây mụn nhọt, chín mé. Cũng có thể đưa đến nhiễm khuẩn huyết.

- *S. aureus* gây một bệnh trên da gọi là hội chứng "bỏng da" hay bệnh Ritter, thỉnh thoảng có thể tìm thấy ở trẻ sơ sinh. Da trở nên đỏ, nhăn nheo và dễ vỡ khi đụng phải với một vùng nhám xung quanh và sau đó tróc da.
- Bệnh về da phổ biến hơn do Staphylococci là bệnh chốc lở. Ở đây nhiễm trùng xảy ra ở bề mặt nông hơn, giống như một miếng băng gắn lên phía ngoài da. Bệnh chốc lở xuất hiện như những vết phồng rỉ nước vàng. Chốc lở có thể xuất hiện ở nhiều vùng trên cơ thể nhưng thường thấy ở vùng xung quanh mũi và trên môi khi có sổ mũi.
- Hội chứng sốc do độc tố. Do *S. aureus* sản xuất độc tố, gây sốt nhanh, nôn mửa và tiêu chảy sau đó đau họng, đau cơ và phát ban rồi tróc da nhất là trong lòng bàn tay và bàn chân. Huyết áp tăng đột ngột dẫn đến sốt và trụy tim. Những nghiên cứu cho thấy hội chứng sốc có thể do vi khuẩn có ở nhiều nơi trong cơ thể, chúng sinh sản và được bao bọc kỹ. Người ta thấy rằng vết thương là cửa ngõ cho vi khuẩn xâm nhập vào mô. Gạc thấm hút tốt sẽ làm Staphylococci phát triển tốt trong điều kiện ẩm dịch bị ứ đọng trong gạc đặt vào vết thương. Khi lấy ra những gạc ứ dịch, hội chứng sốc được giảm. Ngày nay người ta thường dùng những gạc có sự hấp thụ dịch kém hơn nhờ những vật liệu thay đổi để tạo một môi trường ít có lợi hơn cho sự phát triển của vi khuẩn.

Viêm tai -mũi-họng: viêm amidan, viêm xoang

Nhiễm khuẩn huyết do biến chứng hay do không chữa trị các bệnh trên.

Ngộ độc do thức ăn do enterotoxin đã có sẵn trong thức ăn nhiễm S. aureus. Triệu chứng: 2-3 giờ sau khi ăn bị tiêu chảy nặng, ói mửa, 24-48 giờ sau thì hết.

Viêm ruột cấp tính do dùng kháng sinh có phổ rộng và ít hấp thu trong thời gian dài diệt những vi khuẩn nhạy cảm để lại S. aureus đề kháng gây ngộ độc.

1.6. Chẩn đoán

- Cấy trên thạch máu: khuẩn lạc tròn, có thể có huyết giải β hoặc γ
- Khảo sát dưới kính hiển vi cho thấy vi khuẩn Gram dương xếp dạng chùm nho đặc trưng hay dạng cặp đôi, chuỗi ngắn.
- Làm phản ứng coagulase, lên men manitol, xem sắc tố, nếu cần thì làm phản ứng desoxy ribonuclease.

1.7. Trị liệu

Penicillin G, cephalosporin. Hiện nay 90% *S. aureus* đã đề kháng ampicillin. Nếu đề kháng methicillin và cephalosporin thì dùng vancomycin. Ngoài ra có thể dùng các macrolid.

2. VI KHUẨN GÂY BỆNH PHONG: *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

2.1. Đại cương

Mycobacterium leprae là tác nhân gây bệnh phong (leprosy hay bệnh Hansen). Từ nhiều thế kỷ bệnh phong được coi như một thảm họa, vì nó không giết chết bệnh nhân nhưng cuộc sống dường như đã chấm dứt.

Vi khuẩn này được Gerhard Armauer Hansen tìm ra vào năm 1874. Vi khuẩn là những trực khuẩn, chỉ bắt màu trong phương pháp nhuộm kháng acid-cồn. Không nuôi được trên môi trường trong phòng thí nghiệm. Đến năm 1960 người ta nuôi được những vi khuẩn này trên bàn chân của chuột, đến năm 1969 các nhà khoa học tại Hansen's Disease Center ở Carville Louisiana đã khám phá ra rằng chúng có thể phát triển trong cơ thể của loài tatu.

2.2. Khả năng gây bệnh

Mycobacterium leprae gây bệnh phong. Bệnh gây tổn thương mạn tính ở biểu mô và dây thần kinh. Bệnh tiến triển chậm, thời gian ủ bệnh có thể kéo dài 3-6 năm. Bệnh phong có hai dạng:

- *Dạng nhẹ* (dạng phong củ): Trên da có những vết nâu, không nhạy cảm, bao quanh bởi một gờ hay những sần nhỏ. Có rối loạn thần kinh, nhưng nhẹ, bệnh tiến triển chậm (trung bình 18 năm).
- *Dạng ác tính* (dạng phong u): Vi khuẩn thâm nhiễm biểu bì tạo nhiều cục cứng và loét tạo vết thương ở da và dây thần kinh. Bệnh nhân sẽ bị mất cảm giác ở những vùng bị tổn thương. Tổn thương thần kinh nặng, tổn thương ở xương, cơ làm co rút cơ, có thể gây rụng đốt ngón tay, chân. Tổn thương với những cục lớn ở ngoài da nhất là vùng vách mũi, tai làm khuôn mặt bị dị dạng.

2.3. Dịch tễ học

Người là tác nhân mang mầm bệnh. Bệnh lây qua những vết thương ở da do tiếp xúc với chất tiết của vết thương người bị bệnh phong. Vi khuẩn tìm thấy rất nhiều trong dạng phong u, dạng phong củ ít hơn. Ngoài da và thần kinh còn có thể tìm thấy vi khuẩn ở đường hô hấp trên, thận, gan, lách và máu.

Lây truyền khá chậm trong các vùng có dịch. Vi khuẩn thải ra có thể sống 1-2 ngày, mỗi ngày một người có thể thải ra 10^8 vi khuẩn.

2.4. Miễn dịch học

Có những người bị nhiễm vi khuẩn nhưng không phát triển thành bệnh do có miễn dịch tế bào tốt, những người có suy giảm miễn dịch sẽ có những biểu hiện lâm sàng.

Nếu đáp ứng miễn dịch tế bào một phần: biểu hiện bệnh lâm sàng sẽ ở dạng phong củ, ít tổn thương và ít vi khuẩn ở mô, ít lây nhiễm. Nhưng nếu miễn dịch tế bào suy giảm biểu hiện lâm sàng sẽ ở dạng phong u, với nhiều chất tiết ở mũi, vết thương ngoài da, là nguồn lây nhiễm rất lớn cho những người xung quanh.

Suy giảm miễn dịch trong bệnh phong chủ yếu liên quan đến lympho T.

2.5. Chẩn đoán

Trực tiếp

Trích từ dịch mũi hoặc vết thương ở da hoặc làm sinh thiết và nhuộm màu tìm dạng vi khuẩn nội bào.

Gián tiếp

Dùng lepromin (chất tiết ra từ mô chứa vi khuẩn hủi) tiêm dưới da, sau 24-48 giờ sẽ cho phản ứng tăng cảm kiểu chậm giống như phản ứng tuberculin. Phản ứng dương tính: dạng củ; phản ứng âm tính là dạng u hủi do không còn miễn dịch. Phản ứng này có thể cho phản ứng chéo với tuberculin.

2.6. Trị liệu

- Có thể dùng các kháng sinh như: rifampicin, dapson, clofazimin, sulfon dùng trong vùng dịch để ngăn chặn sự lan truyền. Phải phối hợp thuốc để tránh kháng thuốc. Hiện nay, điều trị theo phác đồ phòng chống phong quốc gia.
- Chủng ngừa: có thể dùng vaccin BCG nhưng kết quả không đồng đều.

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Có thể nhận định *S. aureus* một cách nhanh chóng và đơn giản dựa vào:

   a. Hình dạng và cách xắp xếp tế bào

   b. Hình dạng khóm

   c. Phản ứng sinh hóa

   d. Phản ứng coagulase

2. *S. aureus* là vi khuẩn gây bệnh:

   a. Chuyên biệt

   b. Cơ hội

   c. Có độc tố nguy hiểm

   d. Tất cả

3. Các chứng bệnh gây ra do *S. aureus* sản xuất độc tố:

   a. Mụn đầu đinh

   b. Tiêu chảy

   c. Viêm họng

   d. Tất cả

4. Cách lây truyền vi khuẩn phong nhiều nhất là qua:

   a. Máu

   b. Tiếp xúc

   c. Vết thương

   d. Rau thai

5. Bệnh phong gây:

   a. Tổn thương ngoài da

   b. Tàn phế

   c. Tổn thương thần kinh

   d. Tất cả

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Madigan, Martinko and Parker. ***Brock Biology of Microorganisms***. 9th edition, 2000.
2. J. C. Sherris. ***Medical Microorganisms***. 3rd edition, Prentice-Hall International Inc., 1994.
3. J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet. ***Manual de Bacterologie Clinique***. 2nd edtion, Elsevier, 1994.

Bài 15

VIRUS GÂY BỆNH

MỤC TIÊU

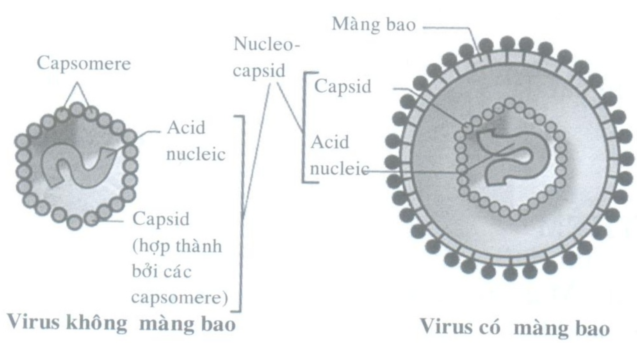
1. *Nêu được cấu trúc và phân loại virus.*
2. *Phân biệt được các giai đoạn, đặc điểm sinh sản ở virus ADN, ARN và retrovirus.*
3. *Nắm được các phương pháp phát hiện virus.*
4. *Trình bày được một số bệnh gây bởi virus, cách phòng ngừa và điều trị.*

1. CẤU TRÚC

Virus là nhóm vi sinh vật gây bệnh nhỏ nhất, kích thước thay đổi 15-300 nm. Một trong những virus lớn nhất là virus đậu mùa có đường kính khoảng 300 nm, gần bằng vi khuẩn nhỏ nhất như Chlamydia, Mycoplasma và một trong những virus nhỏ nhất là virus bại liệt có đường kính chỉ 28 nm.

Các đặc tính chung của virus: không phải là tế bào, ký sinh nội bào bắt buộc, tùy thuộc hoàn toàn vào bộ máy tổng hợp protein và nguồn năng lượng của tế bào chủ. Virus có cả hai trạng thái nội bào và ngoại bào.

Cấu trúc cơ bản của virus gồm acid nucleic (ARN hoặc ADN dạng sợi đôi hay sợi đơn) và capsid (vỏ protein), gọi là ***nucleocapsid***. Một số nucleocapsid được bọc trong ***màng bao*** (hình 15.1). Hạt virus hoàn chỉnh gọi là ***virion***.



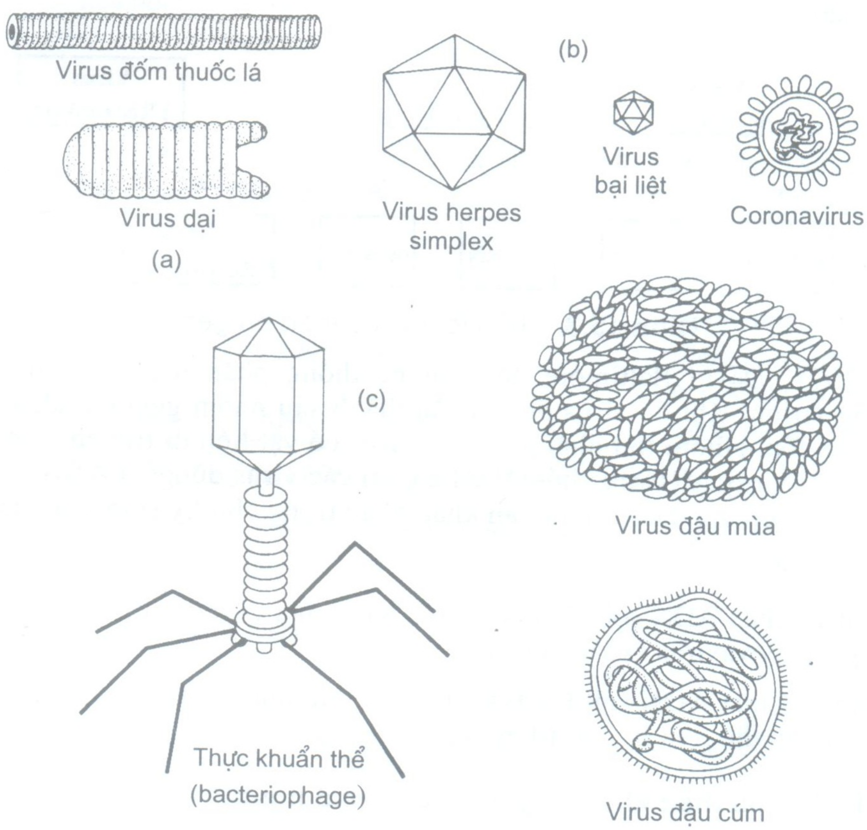
Hình 15.1. Cấu trúc virus có màng bao và không có màng bao

Capsid được cấu tạo bởi các tiểu đơn vị protein riêng lẻ là capsomere. Số lượng capsomere đặc trưng cho mỗi virus. Ví dụ, capsid của herpes đường sinh dục có 162 capsomere, capsid của adenovirus có 252 capsomere. Capsid khá bền với nhiệt, pH và các thay đổi của môi trường. Ở một số virus, protein capsid biệt hóa thành các enzym trợ giúp việc xâm nhập vào tế bào ký chủ. Ngoài ra, capsid cũng kích thích tạo đáp ứng miễn dịch trong thời gian mắc bệnh.

Màng bao (envelope) cấu tạo bởi hai lớp lipid (có đặc tính giống màng tế bào ở một số chủ thể) và protein mang đặc tính của virus. Ở một số virus như cúm, sởi… màng bao còn có gai chứa các enzym trợ giúp virus tấn công. Màng bao có thể làm cho không thấy rõ dạng của capsid.

Virus có thể có nhiều dạng: (hình 15.2)

- Hình xoắn (helix, helical virus) như virus đốm thuốc lá, virus dại (a).
- Hình khối 20 mặt (icosahedron, icosahedral virus) như herpes simplex, virus bại liệt… cấu tạo bởi 20 mặt tam giác và 12 góc (b).
- Một số virus phối hợp cả 2 dạng này (complex virus) như vài dạng thực khuẩn, virus đậu mùa (c).



Hình 15.2. Các dạng cấu trúc của virus

2. PHÂN LOẠI

Mặc dù sự tồn tại của virus đã được chứng minh bởi Beijerink từ năm 1898, nhưng đến năm 1920 người ta mới bắt đầu phân loại chúng. Sự phân loại virus chủ yếu dựa vào triệu chứng bệnh và cách truyền virus. Ví dụ nhóm virus gây viêm gan gồm các virus có cùng đặc tính gây viêm gan là virus viêm gan A, virus viêm gan B, virus sốt vàng da, virus sốt Rift Valley.

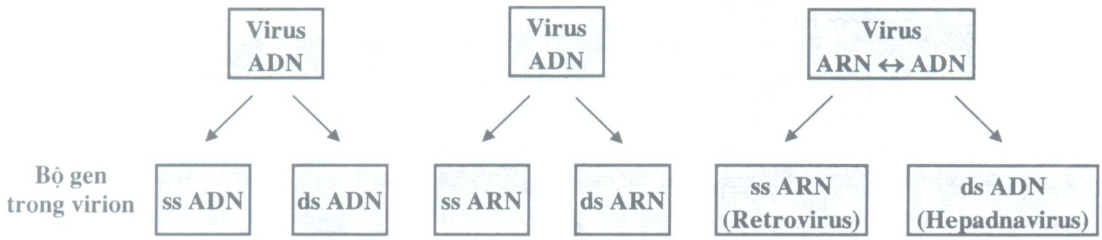
Từ 1940-1970, phân loại virus được dựa vào hình thái virion (kích thước tiểu phân, cấu trúc), đặc tính sinh học (các đặc tính của virus và huyết thanh học), đặc tính lý hóa của virus (bản chất và kích thước genome, số lượng và kích thước protein virus).

Từ 1970 trở đi, phân loại virus theo trình tự genome và kiểu sao chép thông tin cũng như mối quan hệ với vật chủ.

Từ những năm 1980 đến nay, người ta phân loại virus theo kích thước, hình dạng, cấu trúc và tính đối xứng (dựa vào kính hiển vi điện tử và kỹ thuật nhuộm âm bản (negative staining), kết hợp với bản chất của genome.

2.1. Phân loại virus theo bản chất bộ gen (genome)

Genome virus chứa thông tin di truyền mã hóa trong ADN hoặc ARN. Acid nucleic của genome virus có thể là sợi đơn hoặc sợi đôi và ở dạng thẳng hoặc vòng hoặc phân đoạn.



Hình 15.3. Phân loại virus theo bộ gen

Năm 1971, David Baltimore đề nghị hệ thống phân loại virus dựa vào acid nucleic trong virion. Khi đó virus được phân thành sáu nhóm genome khác nhau nằm trong ba nhóm lớn. Nhóm thứ nhất gồm các virus có vật liệu di truyền là ADN, nhóm thứ hai gồm các virus ARN và nhóm thứ ba gồm các virus dùng cả ADN và ARN làm vật liệu di truyền nhưng ở các giai đoạn khác nhau trong chu kỳ sinh sản của chúng.

Genome chứa ADN

- Nhóm 1: Chứa ADN sợi kép (ds ADN). Ví dụ như Adenovirus, Herpesvirus (xoắn thẳng), Papovavirus (xoắn vòng).
- Nhóm 2: Chứa ADN sợi đơn (ss ADN). Ví dụ như Parvovirus (dạng thẳng), vài thực khuẩn thể trên *E. coli* (dạng vòng).

2.2. Phân loại virus theo khả năng gây bệnh cho người

Genome chứa ARN

- Nhóm 3: Chứa ARN sợi đơn (ss ARN). Gồm loại có ARN sợi dương, cùng phân cực giống mARN (các Picornavirus, Togavirus, Flavivirus) và loại có ARN sợi âm, phân cực đối nghịch với mARN (các Paramyxovirus, Arenavirus, Orthomyxovirus, Rhabdovirus).
- Nhóm 4: Chứa ARN sợi kép (ds ARN). Ví dụ như Reovirus.

Bảng 15.1. Phân loại một số virus gây bệnh cho người

Nhóm liên quan	Họ	Acid nucleic	Bao	Chi	Bệnh nhiễm quan trọng
Da, niêm mạc	Herpesviridae	ADN	+	*Varicellovirus*	Thủy đậu (varicella)
				Alphaherpesvirinae	Bệnh Herpes
	Poxviridae	ADN	+	*Orthopoxvirus*	Đậu mùa (variola)
	Paramyxoviridae	ARN	+	*Morbillivirus*	Sởi (measle, rougebole)
				Rubulavirus	Quai bị (mumps)
Đường hô hấp	Orthomyxoviridae	ARN	+	*Influenzavirus A, B*	Cúm (influenza)
	Picornaviridae	ARN	0	*Rhinovirus*	Cảm lạnh (cold)
	Coronaviridae	ARN	+	*Coronavirus*	SARS
	Adenoviridae	ADN	0	*Mastadenovirus*	Viêm đường hô hấp
Nội quan, Sinh dục, Máu	Picornaviridae	ARN	+	*Enterovirus*	Coxsackie, ECHO ...
				Hepatovirus	Viêm gan virus siêu vi A (HAV)
	Flaviviridae	ARN	+	*Flavivirus*	Sốt Dengue, sốt vàng da
				Virus viêm gan C	Viêm gan virus (HCV)
	Coronaviridae	ARN	+	*Coronavirus*	Viêm ruột do virus (viralgastroenterotitis)
	Retroviridae	ARN	+	*Lentivirnae*	AIDS
Hệ TKTW	Rhaboviridae	ARN	+	*Lyssavirus*	Bệnh dại (rabies, rage)
	Bunyaviridae	ARN	+		Viêm não (arboviral encephalitis)
	Picornaviridae	ARN	0	*Enterovirus*	Bệnh bại liệt (polio)

Genome chứa ARN chuyển đổi thành ADN và ngược lại

- Nhóm 5: Có retrovirus chứa ARN nhưng sao chép qua ADN trung gian.
- Nhóm 6: Có HBV người chứa ADN trong virion nhưng có ARN trong sao chép.

3. QUÁ TRÌNH NHÂN LÊN CỦA VIRUS

Sự nhân lên của virus gồm 3 giai đoạn chính (hình 15.4).

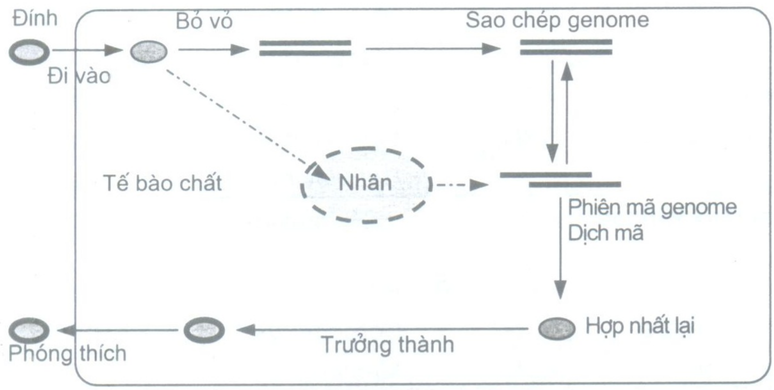
1. Nhiễm khởi đầu gồm các bước: Gắn tế bào, xâm nhập và bỏ vỏ.
2. Sao chép và biểu hiện gen virus.
3. Phóng thích virion trưởng thành từ tế bào nhiễm gồm các bước sau: Hợp nhất lại, trưởng thành và phóng thích.

3.1. Khởi đầu

Gắn vào

Đây là sự gắn đặc hiệu của protein đính -virus vào thụ thể của tế bào. Thụ thể virus trên bề mặt tế bào là glycoprotein hoặc gốc carbohydrat trên glycoprotein. Đây là quá trình tự động. Động học gắn thụ thể được kiểm soát bởi đặc tính hóa học và nhiệt động học của các phân tử tham gia.

Pha gắn có ảnh hưởng chính đến sự gây bệnh của virus và quyết định thời gian nhiễm của virus.



Hình 15.4. Sự nhân lên của virus

Xâm nhập

Xảy ra trong thời gian khá ngắn, thường là vài phút. Quá trình này cần năng lượng. Các cơ chế xâm nhập bao gồm: thực bào (endocytosis) là cơ chế phổ biến nhất, dung hợp (fusion) chỉ ở virus có màng bao, chuyển vị (translocation) xảy ra khá hiếm và bơm (injection) xảy ra ở hầu hết thực khuẩn thể.

Bỏ vỏ

Xảy ra sau khi virus xâm nhập vào hoặc khi màng virus hợp nhất màng tế bào (đối với virus có màng bao). Lúc này capsid virus bị thoái hóa từng phần hoặc hoàn toàn hoặc loại bỏ và phóng thích bộ gen của virus.

Sự bỏ vỏ xảy ra trong thể nhân hoặc trực tiếp trong tế bào chất.

3.2. Sự phiên mã và sao chép genome

Virus ADN

Nhờ một protein của virus nên ADN virus không bị cắt bởi DNase của tế bào chủ.

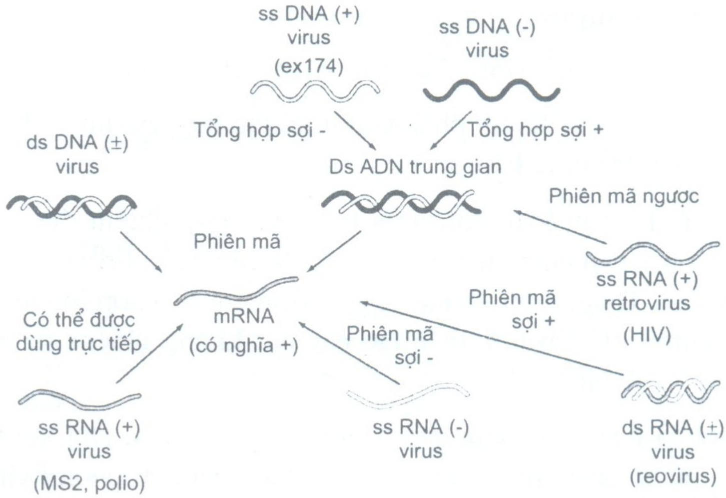
Phiên mã và sao chép genome của virus ADN sợi kép xảy ra trong nhân (Adenovirus, Baculovirus, Herpesvirus…) hay xảy ra trong tế bào chất (virus đậu mùa có polymerase trong virion). Ở virus ADN sợi đơn, phiên mã và sao chép genome xảy ra trong nhân, tạo sợi kép ADN trung gian trước khi tạo mARN (các parvovirus).

Virus ARN

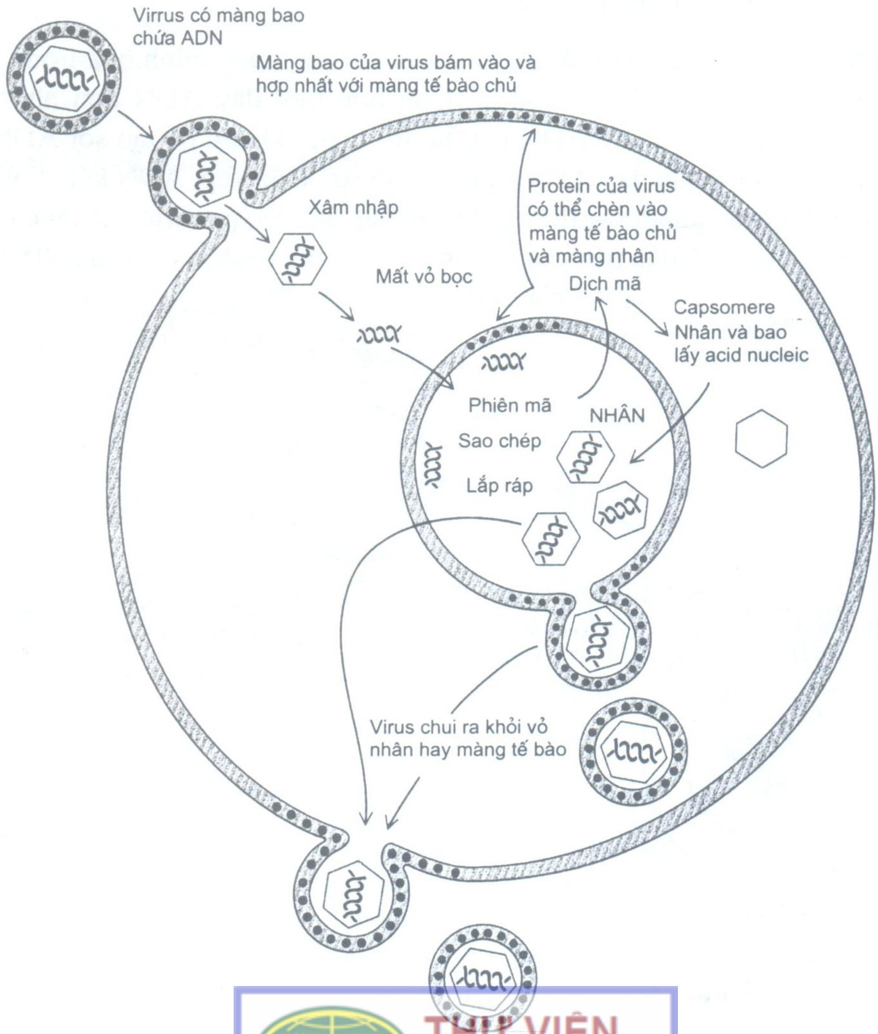
Ở virus có ARN sợi kép (Reovirus, có polymerase trong virion), sao chép xảy ra trong tế bào chất, sợi âm ARN được phiên mã thành mARN.

Ở virus ARN dương, sợi dương ARN có thể được phiên mã trực tiếp thành mARN (virus bại liệt) hoặc dùng enzym reverse transcriptase để phiên mã ngược thành sợi kép ADN trung gian, sau đó tạo mARN (các retrovirus).

Ở virus ARN âm, sợi âm ARN được phiên mã thành mARN.



Hình 15.5. Sự phiên mã của virus



Hình 15.6. Sự nhân lên ở virus có màng bao chứa AND

3.3. Sự hợp nhất, trưởng thành và phóng thích

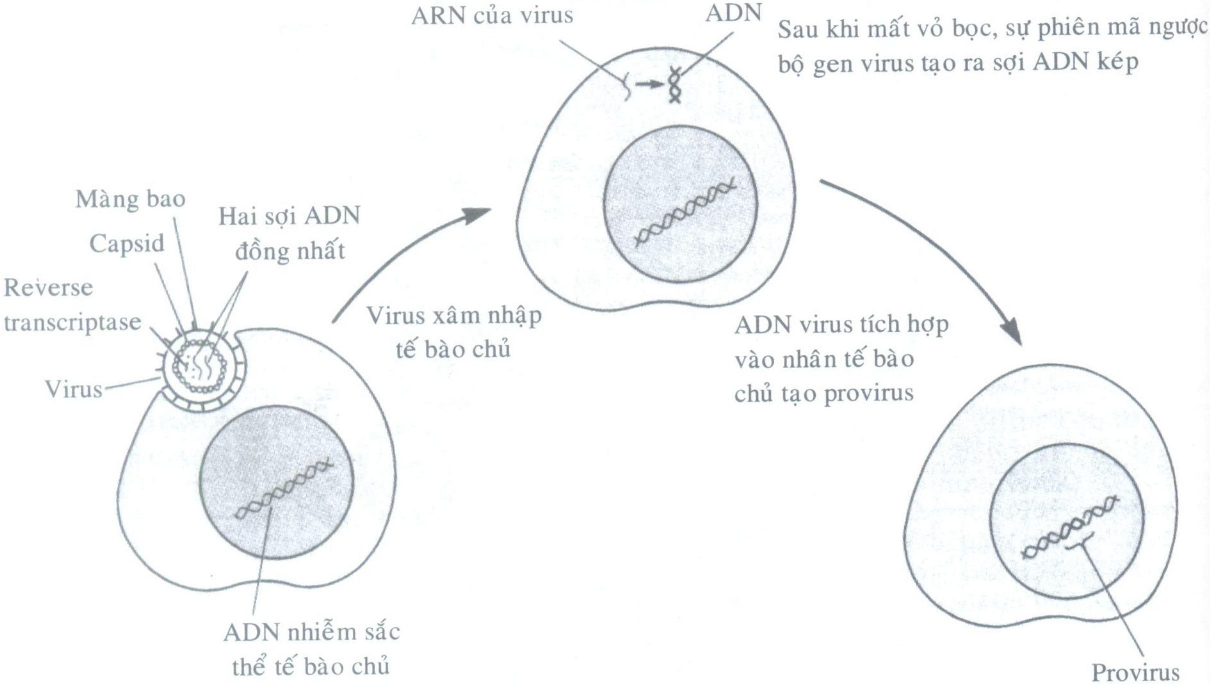
Giai đoạn cuối của quá trình nhân bản virus gồm ba bước.

Hợp nhất là tất cả các thành phần cần thiết tập hợp với nhau để tạo virion trưởng thành ở vị trí đặc biệt trong tế bào.

Trưởng thành là giai đoạn hạt virus trở thành gây nhiễm được. Khi sự hợp nhất hoặc trưởng thành bị ngăn chặn, hạt virus tạo ra là các capsid rỗng không chứa genome, sẽ không gây nhiễm. Thường thì loại không gây nhiễm cao hơn loại nhiễm nhiều. Ví dụ ở các tế bào nhiễm virus bại liệt, tỉ lệ tạo các hạt không nhiễm so với các hạt nhiễm khoảng từ 30 đến 1.000 lần.

Phóng thích là bước cuối của quá trình sao chép virus. Đối với virus ly giải (hầu hết virus không màng bao) thì tế bào nhiễm vỡ bung và giải phóng virus. Đối với virus có màng bao thì virus nảy mầm qua màng tế bào và ra khỏi tế bào (hình 15.6) hoặc vào bóng nội bào trước khi phóng thích.

Toàn bộ quá trình sao chép đặc biệt của retrovirus được minh họa trong hình 15.7. ARN của virus được dùng làm khuôn để tổng hợp một dây ADN đơn nhờ có enzym reverse transcriptase, sau đó dây ADN này lại trở thành khuôn để tạo sợi ADN bổ sung. ARN của virus bị hủy và hai dây ADN xoắn lại tạo sợi xoắn kép. ADN kép đi vào nhân và chèn vào một trong các nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, tạo provirus, tiếp tục mã hóa cho một retrovirus mới (đây là tiến trình của virus gây ung thư bạch cầu và của HIV).



Hình 15.7. Cơ chế tạo provirus của Retrovirus

4. TÁC ĐỘNG CỦA VIRUS NHIỄM TRÊN TẾ BÀO CHỦ

Khi nhiễm vào tế bào chủ, virus có thể gây ra bốn loại tác dụng sau: nhiễm ly giải làm phá hủy và chết tế bào; không gây chết nhưng chuyển thể tế bào bình thường thành u; nhiễm dai dẳng và nhiễm tiềm ẩn (hình 15.8).

4.1. Phá hủy và làm chết tế bào

Tác dụng hủy hoại tế bào của virus có thể dễ dàng quan sát bằng kính hiển vi quang học khi tế bào đang bị nhiễm nhiều nhất trong mô nuôi cấy. Tế bào chết có thể vì bị virus làm ngừng tổng hợp ARN, ADN hoặc protein của tế bào. Cơ chế đáp ứng khác nhau và có thể có cạnh tranh ARN polymerase II nhân thật và các yếu tố phiên mã của tế bào, thoái hóa mARN tế bào chủ, bất hoạt phức protein gắn cAMP và những cơ chế khác. Virus nhiễm cũng có thể cảm ứng chương trình chết của tế bào (apoptosis). Tác dụng của virus nhiễm trên tế bào chủ trong môi trường của cơ thể (*in vivo*) khó nghiên cứu hơn là trong tế bào nuôi cấy (*in vitro*). Các rối loạn chức năng do tác dụng gần gây chết của virus trên tế bào (ví dụ các thay đổi về thành phần của khung tế bào) và tác dụng thứ cấp do đáp ứng miễn dịch và phản ứng viêm là các yếu tố quan trọng.

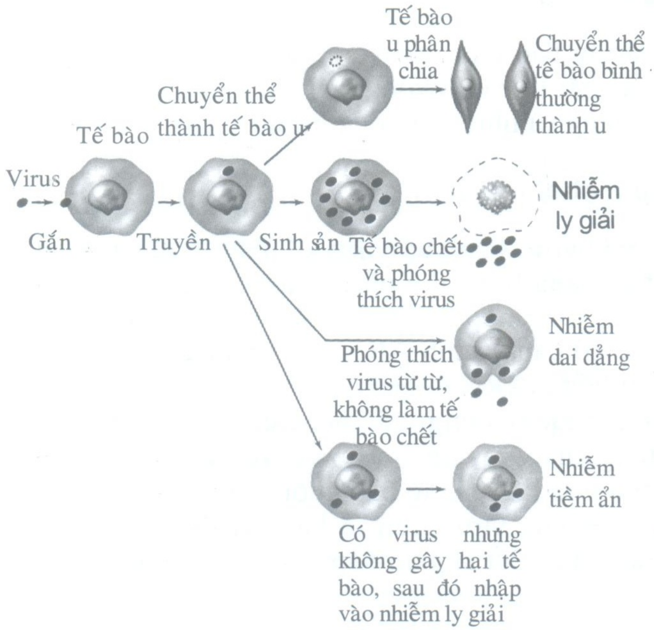
4.2. Chuyển thể tế bào bình thường thành u

Nhiều thay đổi về cấu trúc và chức năng có thể xảy ra trong tế bào khi tế bào không bị giết bởi virus nhiễm. Các thay đổi này thường có trong sao chép của virus có bao, phóng thích bằng cách nảy chồi qua màng tế bào (ví dụ virus cúm). Trong cơ thể, sự hiện diện của các kháng nguyên đặc hiệu cho virus trên bề mặt tế bào khởi đầu đáp ứng miễn dịch, hạn chế tế bào bị nhiễm. Các thay đổi của màng sinh chất cũng có thể làm thay đổi chức năng tế bào chủ, do đó nhiễm virus có màng bao dẫn đến ***dung hợp tế bào*** và tạo ***tế bào đa nhân***.

Có lẽ nghiên cứu quan trọng nhất và nhiều nhất về tác động không gây chết của virus là chuyển thể tế bào do sự hiện diện của ADN virus. Đặc trưng của hiện tượng này là thay đổi di truyền từ kiểu hình bình thường thành kiểu hình "chuyển thể". Các tế bào chuyển thể có một số đặc tính khác tế bào bình thường. Ví dụ chúng tăng trưởng có mật độ cao hơn khi nuôi cấy, tăng trưởng ít định hướng hơn, ít phụ thuộc sự cung cấp yếu tố tăng trưởng hơn, tạo khuẩn lạc trên thạch mềm. Chúng có xu hướng nổi bướu ung thư ở động vật hoặc chuột tổn thương miễn dịch và biểu hiện điển hình một số chức năng của virus chuyển thể.

4.3. Nhiễm virus dai dẳng và tiềm ẩn

Trong nhiễm dai dẳng, virus nhân lên liên tục trong thời gian dài. Sinh vật bị nhiễm virus dai dẳng là do mất khả năng phòng vệ, không kết thúc quá trình nhiễm được. Ví dụ: nhiễm mạn tính virus viêm gan B. Trong nhiễm tiềm ẩn, bộ gen virus vẫn còn trong tế bào ở trạng thái không sao chép, hoặc là hợp nhất vào ADN tế bào chủ hoặc là một episome độc lập. Một số gen virus có thể biểu hiện khi tiềm ẩn và một số tái kích hoạt nhiễm tiềm ẩn. Tiềm ẩn là đặc trưng quan trọng của nhiễm các virus herpes. Ví dụ các virus herpes simplex, virus varicella-zoster, virus Epstein-Barr.



Hình 15.8. Tác động vủa virus nhiễm trên tế bào chủ

5. CHẨN ĐOÁN

5.1. Các phương pháp trực tiếp

Các phương pháp để tìm virus khó, tốn thời gian hơn tìm vi khuẩn. Lý do virus đòi hỏi tế bào ký chủ phải sống để sinh sản, phải có đủ các loại mô sống phù hợp để tăng sinh virus.

Một số phương pháp trực tiếp thường sử dụng:

- *Cấy phôi:* Cấy virus vào trứng có phôi.
- *Cấy tế bào:* Dùng tế bào tách khỏi mô sống và nhân tế bào còn khả năng phân chia. Cho tế bào vào trong dung dịch dinh dưỡng, sau đó cấy virus vào trong tế bào. Các loại tế bào thường dùng là tế bào thận khỉ, tế bào thận thỏ, tế bào phôi người. Các tế bào bắt nguồn từ những tổ chức ung thư cổ tử cung (tế bào Hela), tế bào ung thư mô lưỡi (tế bào KB) hoặc tế bào bị ung thư hóa trong quá trình nuôi cấy như tế bào thận chuột con (tế bào BHK), tế bào thận khỉ (tế bào Vero) cũng được dùng nhiều.
- *Quan sát kính hiển vi điện tử:* Mẫu mô có thể được xem xét trực tiếp hay sau khi phong phú bằng nuôi cấy.

Thực khuẩn thể được xem như một mô hình để nghiên cứu các giai đoạn phát triển của virus.

5.2. Các phương pháp gián tiếp

Các phương pháp này tìm kháng thể chống virus trong huyết thanh bệnh nhân. Một số phương pháp gián tiếp hay sử dụng:

- Phản ứng cố định bổ thể.
- Phản ứng miễn dịch men (ELISA) hay miễn dịch huỳnh quang (FIA).
- Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu.
- Phát hiện acid nucleic của virus theo PCR hay RT -PCR

6. TRỊ LIỆU

Kháng sinh không có tác dụng vì virus ký sinh nội bào, không có cấu trúc riêng cần thiết cho sự tăng trưởng và chuyển hóa. Thường sử dụng các hóa liệu pháp sau để ức chế sự nhân lên của virus.

Chất ức chế virus bám vào thụ thể bề mặt tế bào chủ. Ví dụ, amantadin bám cạnh tranh những vị trí trên bề mặt tế bào cần cho việc cố định của hạt virus.

Các chất ức chế tổng hợp acid nucleic. Ví dụ các chất có cấu trúc tương tự nucleosid như iodosuridin gây chèn sai vào ADN virus, làm cho virus không thể sao chép được. Azidothymidin (AZT), dideoxyinosin (DDI) và dideoxycitidin (DDC) điều trị AIDS do ức chế enzym reverse transcriptase.

Các chất ức chế tổng hợp protein. Ví dụ methiazon.

Các chất ức chế protease. Ví dụ indinavir, ritonavir, saquinavir.

Các loại khác. Ví dụ foscarnel, novirapin.

Huyết thanh chứa các kháng thể đặc hiệu chống virus (IgG, IgA, IgM...) để phòng ngừa, trị liệu.

Interferon là những chất có bản chất protein, được sản xuất từ các tế bào được kích thích do nhiễm virus. Cơ chế tác động chính chưa được biết nhưng có khả năng ức chế virus nhân lên trong tế bào, kích thích hoạt động miễn dịch như tăng khả năng thực bào của đại thực bào...

Vaccin có thể được sản xuất bằng cách làm bất hoạt virus bằng tác nhân lý, hóa hoặc sử dụng virus sống giảm độc lực.

7. NHỮNG VIRUS GÂY BỆNH CHỦ YẾU Ở NGƯỜI

7.1. Virus gây bệnh ở da và niêm mạc

Virus đậu mùa (smallpox virus, variola virus)

Đại cương - hình thể: Thuộc họ *Poxviridae*, các virus họ này thường gây nhiễm chim, động vật có vú và côn trùng. Là virus ADN. Virus đậu mùa khá lớn (kích thước 0,1 x 0,2 x 0,3 µm), hình viên gạch hoặc trứng. Cấu trúc phức tạp, sao chép trong tế bào chất của tế bào nhiễm, có màng bao không cần phải nảy mầm và không cần cho sự nhiễm.

Khả năng gây bệnh. Virus gây bệnh đậu mùa, bắt đầu bằng sốt, sau đó biểu hiện bởi vết thương trên da. Có hai dạng đậu mùa là dạng nặng và dạng nhẹ.

Bệnh truyền nhiễm từ người sang người do tiếp xúc với chất bài tiết từ vết thương ở da hay qua đường hô hấp hay do dụng cụ nhiễm.

Chẩn đoán. Nuôi được trong phôi gà (gây những nốt bọc trên màng đệm) và nhiều tế bào nuôi cấy *in vitro* khác. Chẩn đoán bằng soi kính hiển vi điện tử; thử kết tủa miễn dịch.

Chủng ngừa. Do không có tác nhân đặc trị, nên chủng ngừa là quan trọng nhất. Vaccin đậu mùa đã có từ lâu (Jenner 1798). Vaccin là virus sống gây bệnh đậu bò, không gây bệnh ở người. Vaccin rất công hiệu và sự chủng ngừa toàn thế giới đã giúp tiêu diệt bệnh đậu mùa.

Virus sởi (measle virus)

Đại cương. Virus sởi thuộc họ *Paramyxoviridae*, chi *Morbillivirus*. Là virus ARN sợi đơn, âm, thẳng.

Khả năng gây bệnh. Bệnh sởi dễ lây. Biểu hiện bởi phản ứng viêm niêm mạc mắt, mũi, đường tiêu hoá và nổi mẩn. Có thể gây biến chứng viêm não, bội nhiễm do vi khuẩn ở đường hô hấp. Bệnh thường gây sốt sau 10 ngày, nổi mẩn sau 14 ngày. Thông thường bệnh qua đi không biến chứng, bệnh được miễn dịch suốt đời.

Chẩn đoán. Dựa trên triệu chứng lâm sàng. Chẩn đoán khẳng định bằng cách phân lập virus từ họng hoặc nước tiểu trong thời gian mới bị nhiễm 5 ngày. Sau đó nuôi cấy trên tế bào đa nhân lớn.

Có thể áp dụng phương pháp kháng thể huỳnh quang trực tiếp trên cặn nước tiểu hoặc mẫu ở họng.

Chẩn đoán huyết thanh dựa vào sự tạo phức hợp ức chế hemagglutin hóa hoặc kháng thể huỳnh quang gián tiếp.

Điều trị. Không có thuốc đặc trị, chủ yếu trị triệu chứng, vệ sinh thân thể, dùng kháng sinh ngừa bội nhiễm.

Chủng ngừa với vaccin virus đã giảm độc cho kết quả tốt.

Virus quai bị (Rubulavirus)

Đại cương. Virus quai bị thuộc họ *Paramyxoviridae*, là virus ARN sợi đơn, âm.

Khả năng gây bệnh. Virus gây bệnh quai bị, là bệnh cấp tính. Virus gây viêm tuyến nước bọt, có khi cả tuyến sinh dục, tụy và màng não. Bệnh lây qua đường hô hấp, nước bọt từ người bệnh sang người lành, đôi khi thành dịch, thường ở nơi đông người (trường học, trại lính...). Người mang mầm bệnh (đôi khi chiếm 25-30%) là nguồn lây nhiễm.

Bệnh quai bị thường là bệnh của trẻ em từ 3-14 tuổi, thanh niên 18-20 tuổi. Miễn dịch sau khi mắc bệnh khá bền vững.

Thời gian ủ bệnh khoảng 15-21 ngày, virus nhân lên ở niêm mạc miệng, kết mạc, xâm nhập vào máu rồi tỏa đi phát triển gây viêm ở các cơ quan như màng não, tuyến sinh dục, tuyến tụy, tuyến nước bọt nhưng từ đây virus lại có thể xâm nhập lại vào máu gây sự đa dạng của bệnh.

Chẩn đoán. Phân lập sớm từ nước bọt, họng hoặc các vị trí nhiễm khác (dịch não tủy, nước tiểu), nuôi cấy trên tế bào thận khỉ, phôi gà.

Chẩn đoán nhanh bằng cách phát hiện trên cặn nước tiểu hoặc họng bằng miễn dịch huỳnh quang.

Chẩn đoán huyết thanh bằng cách dùng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu, phản ứng ELISA trên kháng nguyên nucleocapsid S (solube) và kháng nguyên V (viral).

Điều trị. Không có thuốc đặc trị. Điều trị triệu chứng.

Chủng ngừa. Dùng vaccin bằng virus sống giảm độc, bảo vệ kéo dài 5-10 năm, áp dụng tiêm chủng cho trẻ 5-10 tuổi chưa mắc bệnh. Có thể kết hợp tiêm chủng với vaccin chống sởi, bại liệt, rubeole.

Virus thuỷ đậu - zona (Varicella-zoster virus)

Đại cương: Virus thuỷ đậu thuộc họ *Herpesviridae*, có ADN sợi kép, xoắn thẳng. Virus có ít tế bào chủ và có chu kỳ nhân lên chậm.

Khả năng gây bệnh. Virus gây bệnh phỏng hay còn gọi là thủy đậu. Đây cũng là một bệnh có nổi mẩn. Thông thường không nặng, nhưng biến chứng có thể gây viêm não, với bệnh nhân bị ung thư máu mắc bệnh có thể gây tử vong. Bệnh dễ truyền nhiễm, phải cách ly bệnh nhân, vật dụng sử dụng phải khử trùng.

Chẩn đoán. Tìm tế bào đa nhân lớn. Virus có thể nuôi cấy từ dịch mụn nước. Nhuộm kháng thể miễn dịch huỳnh quang tìm kháng nguyên trong tế bào vết thương tróc.

Điều trị. Không có thuốc đặc trị, nên phải cách ly, điều trị như bệnh sởi.

Phòng bệnh. Dùng vaccin sống.

7.2. Virus gây bệnh đường hô hấp

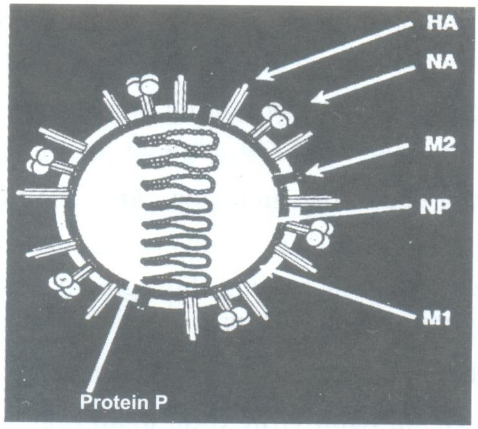
Virus gây bệnh cảm

Virus gây bệnh cảm gồm nhiều loại: Rhinovirus, Adenovirus, Parainfluenza, Syncytial virus, Coxackie virus. Thời gian ủ bệnh ngắn, từ 12-72 giờ. Truyền nhiễm do tiếp xúc trực tiếp (không khí, nước bọt ...) hay gián tiếp do vật dụng.

Bệnh nhẹ, tự hết nhưng phải ngừa bội nhiễm vi khuẩn. Không có miễn dịch đáng kể.

Virus cúm

Đại cương. Các virus cúm thuộc họ *Orthomyxoviridae*, có màng bao. Genome ARN sợi đơn. Phân thành ba nhóm huyết thanh chính A, B và C dựa vào sự khác nhau của kháng nguyên ribonucleoprotein. Cúm A được nghiên cứu nhiều nhất và có khuynh hướng thay đổi kháng nguyên đáng kể. Cúm B có tính kháng nguyên ổn định hơn và bùng phát có tính địa phương. Cúm C gây bệnh rất ít.



Hình 15.9. Virus cúm A

Virus cúm A và B có nucleocapsid chứa tám mẩu ARN sợi đơn âm, được bao trong màng glycolipid lấy từ màng nguyên sinh tế bào chủ. Phía trong màng có lớp protein đặc hiệu của virus. Hai glycoprotein đặc hiệu của virus là hemagglutinin và neuraminidase được gắn vào mặt ngoài của màng bao và là "những gai" khắp bề mặt virion (hình 15.9). Cúm C khác là chỉ có bảy mẩu ARN và không có neuraminidase, mặc dù nó có khả năng phá thụ thể khác. Ngoài ra hemagglutinin của cúm C gắn vào thụ thể tế bào khác với thụ thể của virus cúm A và cúm B.

Hemagglutinin có tên xuất phát do nó có khả năng kết tập *in vitro* hồng cầu một số loài như chim gà, lợn. Chức năng là gắn vào các vị trí thụ thể mucoprotein ở bề mặt tế bào hô hấp của người – đây là bước khởi đầu để nhiễm vào tế bào.

Neuraminidase là enzym thủy phân kháng nguyên, hoạt động trên các thụ thể mucoprotein của hemagglutinin bằng cách cắt đầu acid neuraminic làm phá hủy hoạt tính của thụ thể. Một số chức năng của neuraminidase:

– Bất hoạt thụ thể mucoprotein tự do được tiết trong đường hô hấp, làm thụ thể không gắn vào hemagglutinin và không ngăn được quá trình gắn vào tế bào của virus.

– Dung hợp màng bao virus với màng tế bào chủ cần cho virus đi vào.

– Hỗ trợ giải phóng các tiểu phần virus mới ra khỏi tế bào nhiễm, để có thể nhiễm tế bào khác.

Kháng thể đặc hiệu với neuraminidase ức chế virus lan truyền trong tế bào chủ bị nhiễm và hạn chế lượng virus phóng thích khỏi tế bào chủ.

Cúm A được phân lập lần đầu năm 1933 bằng nuôi cấy trong mũi chồn sương (chồn furô) gây bệnh hô hấp sốt. Hiện nay virus thường được nuôi trong túi màng ối của phôi gà, tế bào thận của khỉ.

Phát hiện. Dựa vào sự gắn hồng cầu với tế bào nhiễm chứa hemagglutinin hoặc ngưng kết tế bào hồng cầu bởi virus đã phóng thích vào dịch ngoại bào. Sau đó thêm kháng thể đặc hiệu trực tiếp tại hemagglutinin, phát hiện bằng kháng thể kháng hemagglutinin. Đến nay đã phát hiện cúm A có 15 loại hemagglutinin ($H_1 \rightarrow H_{15}$) và 9 loại neuraminidase ($N_1 \rightarrow N_9$).

Phòng bệnh. Dùng vaccin virus chết từ các chủng liên quan gần nhất. Vaccin này chứa virion nguyên vẹn hoặc phần tách tiểu đơn vị của kháng nguyên hemagglutinin. Thường dùng hai liều cách nhau một tháng để tiêm cho trẻ em hoặc một liều mỗi năm trước mùa cúm. Hiệu quả vaccin thay đổi và cần tiêm nhắc hàng năm có hiệu quả 70-85%.

Uống amantadin hydrochlorid, là một amin đối xứng có hiệu quả được vài tuần, do ức chế virus bỏ áo hoặc phiên mã ARN ban đầu của virus. Thuốc có thể có tác dụng phụ nên chỉ cho bệnh nhân nguy cơ cao dùng trong khi chờ vaccin gây cảm ứng miễn dịch.

Điều trị. Điều trị không đặc hiệu, chữa triệu chứng và phòng biến chứng (đặc biệt bội nhiễm vi khuẩn).

Liệu pháp amantadin uống: amantadin hydrochlorid sớm khi nghi ngờ bị cúm A cao trong 4-5 ngày.

7.3. Virus gây bệnh hệ thần kinh trung ương

Virus gây bệnh dại (Rabies virus)

Đại cương. Virus dại thuộc họ *Rhabdoviridae*, có ARN sợi đơn.

Khả năng gây bệnh. Virus gây bệnh dại ở thú nhưng có thể lây sang người do bị súc vật cắn hay cào. Súc vật hay mắc bệnh dại là chó, mèo, sóc, chồn. Virus sinh sản nơi xâm nhập, rồi theo dây thần kinh đến hệ thần kinh trung ương.

Chẩn đoán. Dùng miễn dịch huỳnh quang, soi kính hiển vi điện tử mô não.

Cấy mô não nhiễm vào chuột đang còn bú. Dương tính nếu chuột chết trong 3-10 ngày. Virus sinh sản trong não.

Điều trị. Bệnh không có thuốc điều trị, tỉ lệ tử vong rất cao.

Phòng bệnh. Chó phải được tiêm phòng.

Sau khi bị súc vật cắn phải rửa sạch vết thương ngay, phải bắt giữ súc vật lại để theo dõi trong 10 ngày xem có bị dại hay không. Vì thời gian ủ bệnh khá dài nên có thể tiêm vaccin ngay từ lúc đầu để trị liệu. Sau thời gian theo dõi nếu súc vật mắc bệnh, phải tiêm ngay huyết thanh trị liệu.

Virus bại liệt (Poliovirus)

Đại cương. Virus bại liệt thuộc họ *Picornaviridae*. Capsid 20 mặt đối xứng: 4 protein capsid (VP1-4), mỗi protein capsid có 60 bản sao. Có một sợi đơn ARN dương, kích thước 7,5-8,0 kb.

Khả năng gây bệnh. Virus bại liệt gây bại liệt, xâm nhập qua đường miệng, sinh sôi rồi vượt tế bào tiêu hóa đi vào tủy sống, phá hủy các nơron thần kinh gây bại liệt.

Điều trị. Không có thuốc đặc trị.

Phòng bệnh. Dùng vaccin loại mất hoạt tính IPV (còn gọi là vaccin Salk, dạng tiêm dưới da) hoặc vaccin uống OPV chứa virus sống giảm độc (vaccin Sabin, dạng uống).

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đặt mục tiêu năm 2005 thanh toán virus bại liệt trên toàn cầu. Từ 2005 đến 2010 sẽ ngừng tiêm chủng bệnh bại liệt.

7.4. Virus gây bệnh nội tạng-máu-sinh dục

Virus viêm gan

Các virus viêm gan gồm có: HAV (Hepatitis A virus) thuộc nhóm *Enterovirus*, HBV (Hepatitis B virus) thuộc họ *Hepadnaviridae* và HCV (Hepatitis C virus) có thể do *Flavivirus*. Ngoài ra còn có HDV, HEV. Đặc tính của các virus này được tóm tắt trong bảng 15.2.

Bảng 15.2. Đặc tính của các virus gây viêm gan virus

Tên	Đường truyền	Genome
HAV	Ruột	ARN sợi đơn dương, thẳng
HBV	Ngoài ruột	ADN sợi kép vòng
HCV	Ngoài ruột	ARN sợi đơn dương, thẳng
HDV	Ngoài ruột	ARN sợi đơn âm, vòng
HEV	Ruột	ARN sợi đơn dương, thẳng

HAV (Hepatitis A virus)

Đặc điểm. Virus không màng bao, hình khối đối xứng đường kính 27 nm, ARN sợi đơn, dương. Người là ký chủ tự nhiên của HAV, một số loài linh trưởng nhạy với virus. Không bị bất hoạt bởi ether, ổn định ở -20^0C và pH thấp.

Khả năng gây bệnh. HAV thường gây viêm gan thể cấp nhưng có thể vượt qua khi nghỉ ngơi bồi dưỡng. Thời gian ủ bệnh ngắn nhất trong các loại viêm gan virus, trung bình từ 2-4 tuần. Gây rối loạn tiêu hóa, đau bụng, nôn, sốt nhẹ sau đó có thể dẫn đến vàng da. Virus có thể kháng một số tác nhân lý hóa như nồng độ clo thường dùng trong nước. Bệnh nhiễm chủ yếu do phân hay nước, thức ăn bị nhiễm, có thể do hoạt động tình dục.

Chẩn đoán. Tìm IgM đặc hiệu với virus trong huyết thanh giai đoạn bệnh cấp. Soi kính hiển vi điện tử trên mẫu phân hoặc tế bào nuôi cấy.

Phòng bệnh. Dùng ISG (Immune serum globulin) sản xuất từ huyết tương.

Điều trị không đặc hiệu. Bồi dưỡng và nghỉ ngơi.

HBV (Hepatitis B virus)

Đặc điểm. Virus sợi kép ADN, có màng bao. Virion hoàn chỉnh (còn gọi là tiểu phần Dane) có hình cầu kích thước 42 nm, gồm hai phần có cấu trúc đồng tâm là màng bao và lõi. Lõi là nucleocapsid chứa genome ADN gồm 3 kb. Đặc biệt ADN của HBV có kiểu sao chép qua giai đoạn trung gian ADN - ARN, được điều khiển tổng hợp bằng ARN polymerase của virus.

Các kiểu gen chính của HBV đã được xác định và ký hiệu từ A đến G.

Khả năng gây bệnh. Virus lây nhiễm qua đường máu, sinh dục là chủ yếu, hoặc truyền từ mẹ sang con. Thời gian ủ bệnh từ 4 tuần đến 6 tháng, một số có thể không có triệu chứng. HBV có thể dẫn đến xơ gan, hay ung thư gan.

Chẩn đoán. Virus có các kháng nguyên HBsAg, HBcAg và HBeAg.

HBsAg (hepatitis B surface antigen) là kháng nguyên có trên bề mặt virus, được tạo ra nhiều trong huyết thanh, dạng hạt hình ống và hình cầu đường kính 22 nm.

HBcAg (hepatitis B core antigen) là kháng nguyên lõi (lõi nucleocapsid) thấy trong nhân tế bào gan bị nhiễm bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

HBeAg (hepatitis B e antigen) là glycopeptid, M_r thấp. Có liên quan đến kháng nguyên lõi, được dùng như dấu hiệu dịch tễ, chỉ quan sát được khi HbsAg cũng hiện diện.

Anti-HBs là kháng thể đối với HBsAg, liên quan phòng vệ chống lại bệnh.

Anti-HBc là kháng thể đối với HBcAg, thấy trong nhiễm cấp tính và mang virus mạn tính; dùng như dấu hiệu nhiễm trong quá khứ, không có vai trò quan trọng để chống lại bệnh.

Anti-Hbe là kháng thể đối với HBeAg.

Chẩn đoán dựa vào triệu chứng vàng da, chứng minh HBsAg trong huyết thanh. Giai đoạn phát hiện HBsAg trong huyết thanh ngắn. Có thể dùng dấu hiệu huyết thanh khác như kháng thể đối với kháng nguyên lõi (anti-HBc). Xác định nhiễm HBV trong quá khứ tốt nhất là phát hiện anti -HBc, anti-HBs hoặc cả hai.

Phòng ngừa. Tiêm chủng bằng HBsAg tái tổ hợp sản xuất từ nấm men (Engerix-B) hoặc tế bào động vật. Tiêm 3 lần cách một tháng, nhắc lại sau một năm. Phòng trẻ sơ sinh bị nhiễm từ mẹ cần tiêm vào 24 giờ, 1 tháng và 6 tháng sau sinh.

Điều trị. Dùng interferon, dùng kháng thể kháng HBV phối hợp vaccin.

HCV (Hepatitis C virus)

Trước đây virus này được phân loại là non -A non-B hepatitis. Mới được phân lập năm 1989 và xác định đặc tính. Virus có màng bao, đường kính 30 - 60 nm, có sợi đơn ARN dương thẳng khoảng 10.000 nucleotid. Sao chép genome virus không qua ADN trung gian, không có sự hợp nhất acid nucleic virus vào ADN tế bào chủ.

Bệnh nhân nhiễm HCV bị viêm gan điển hình và trở thành nhiễm mạn tính (50% trường hợp viêm gan), gây ung thư gan nguyên phát qua xơ gan và tái tạo tế bào gan.

HCV có khắp thế giới. Chủ yếu bị mắc phải do truyền máu hoặc lạm dụng ma túy qua tĩnh mạch, ít truyền qua đường tình dục.

Chẩn đoán. Kháng nguyên gốc có thể phát hiện qua kháng thể kháng HCV trong huyết tương bệnh nhân nhiễm bằng ELISA. Trình tự nucleotid của HCV đã được xác định nên có thể dùng PCR (RT-PCR) để kiểm tra trực tiếp genome virus.

Vaccin. Virus không nuôi cấy *in vitro* được, tuy nhiên có thể phát triển vaccin theo cách đã áp dụng với vaccin kháng *Flaviviruses* và *Pestivirusesa*. Vaccin tái tổ hợp gặp khó khăn do các nhóm virus HCV có trình tự phong phú và các chủng phân lập khác nhau nhiều ở vùng đầu amin của E2 /NS.

Điều trị. Dùng interferon.

HDV (Hepatitis D virus)

Virus có sợi đơn ARN, kích thước nhỏ, cần HBsAg để truyền nhiễm. Chỉ thấy ở bệnh nhân HBV cấp và mạn tính. Ngăn HBV thì sẽ ngăn được HDV. Chẩn đoán dựa vào tìm IgM và/hoặc IgG kháng α-delta Ag trong huyết tương. IgM xuất hiện trong 3 tuần và tồn tại vài tuần, IgG vài năm.

Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch người (Human Immunodeficiency Virus, HIV)

Đại cương

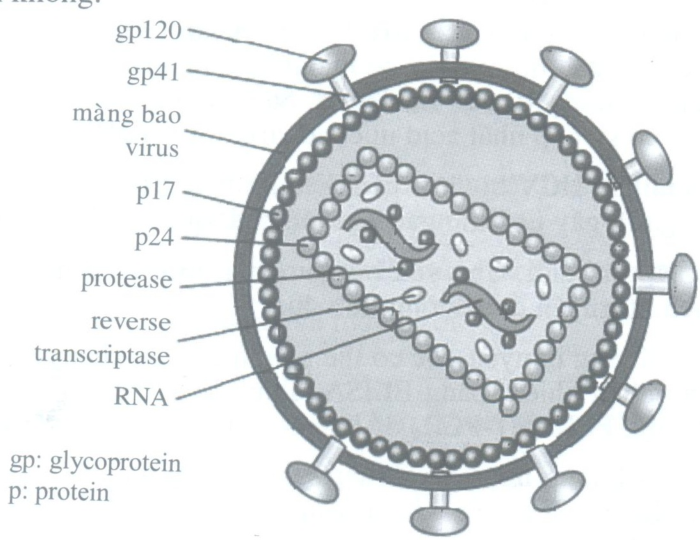
HIV là một retrovirus có hai sợi đơn ARN. Màng bao của virus có chứa phức protein Env, phức này gồm có chóp glycoprotein 120 (gp120) nhô ra ngoài và cuống gp41.

Trong màng bao của virus có protein HIV là p17 (matrix), và trong nữa là lõi (capsid) của virus được làm bởi một protein khác của virus là p24 (kháng nguyên lõi). Lõi virus chứa hai sợi đơn ARN HIV, protein p7 (nucleocapsid), và ba protein enzym: p51 (reverse transcriptase), p11 (protease) và p32 (integrase).

HIV có ái lực với thụ thể trên tế bào lympho T CD4 do có gp120 của lớp màng bao, sẽ làm cho 2 màng hòa lẫn vào nhau. ARN của virus được phóng thích vào cùng với reverse transcriptase, sau đó virus sẽ sinh sôi.

Sau khi ADN virus mới tạo ra gắn được vào ADN nhân của tế bào thì lympho T không còn khả năng sinh sôi nữa. Quá trình phá hủy xảy ra chậm khoảng 5 đến 10 năm, hoạt động của hệ miễn dịch bị ngăn chặn, cơ thể bị mất khả năng bảo vệ sự nhiễm trùng. HIV sinh sản có thể cho 80-90 virion. Sau đó lympho T ly giải và phân tán HIV.

Ở người bình thường, CD4 chiếm khoảng 600-700 tế bào/μl. Ở người bệnh, số CD4 giảm dần đến không.



Hình 15.10. Cấu trúc virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch người (HIV)

Khả năng gây bệnh

Bản thân HIV không gây ra bệnh, bệnh nhiễm do vi khuẩn cơ hội xâm nhập khi hệ miễn dịch cơ thể bị suy yếu. Bệnh lây truyền bằng đường máu, sinh dục hay từ mẹ truyền qua con. Dấu hiệu lâm sàng bắt đầu có khi số tế bào lympho còn dưới 200 trong một microlit máu.

Chẩn đoán

Việc kiểm tra HIV được tiến hành khi có hai trong các triệu chứng chính là giảm cân hơn 10%, tiêu chảy hơn một tháng, sốt kéo dài hơn một tháng, lao; và một trong các triệu chứng phụ là ho hơn một tháng, ngứa nổi mẩn, tiền sử herpes trong hai năm cuối, nhiễm nấm ở miệng hoặc họng, herpes và hạch lympho lớn.

Thử nghiệm sàng lọc ban đầu là ELISA để phát hiện protein vỏ (Env). Vì đôi khi có phản ứng dương giả, phân tích Western blot được dùng để khẳng định sự hiện diện của kháng thể đối với virus.

Western blot tìm HIV tiến hành như sau. Chiết protein virus tinh khiết, phân tích trên SDS -PAGE, chuyển qua màng nitrocellulose, ủ với huyết thanh bệnh nhân. Nếu có kháng thể đối với protein HIV -1, nó sẽ gắn chính xác vào protein tương ứng trên màng và cho những băng có trọng lượng phân tử thích hợp có thể quan sát được với các thuốc thử kháng Ig.

Mới gần đây, người ta dùng RT -PCR để phát hiện bộ gen ARN của hạt virus tự do trong máu. RT -PCR được tiến hành như sau. Trước hết phiên mã ngược ARN thành ADN, sau đó ADN tạo thành được khuếch đại. Phương pháp này có thể phát hiện nhiễm HIV trước khi có kháng thể sinh ra, và quan trọng hơn là có thể dùng nó để theo dõi bệnh và thành công của trị liệu (dùng real time PCR).

Điều trị

Chưa có thuốc đặc trị, do virus trốn trong các tế bào nhiễm, hoặc trong tế bào thần kinh, não. Việc nghiên cứu đi vào các hướng: ức chế virus đi vào tế bào, ức chế integrase, dùng nucleosid ức chế reverse transcriptase (NRTI), ức chế reverse transcriptase không phải là nucleosid (NNRTI), ức chế protease (PI). Việc trị liệu gồm nhiều hướng khác nhau, cần phối hợp từ hai thuốc kháng retrovirus (ARV) trở lên. Các thuốc này không chữa trị được HIV/AIDS nhưng ngăn chặn sự nhân lên của HIV, cho phép hệ miễn dịch hồi phục. Nếu ngưng dùng thuốc ARV, bệnh HIV sẽ tiến triển.

- Các nucleosid ức chế reverse transcriptase (NRTI): azidothymidin (AZT), dideoxyinosin (ddI), dideoxycitidin (ddC), d4T, 3TC, ABC, FTC.
- Các chất ức chế protease (PI): SAQ1, IND, RTV, NFV, SAQ2, AMP, KAL, ATV, FOS
- Các chất ức chế reverse transcriptase không phải là nucleosid: NVP, DLV, EFV
- Ức chế virus đi vào tế bào: CD4 hoà tan.
- Interferon: Giảm sự đâm chồi của HIV, chống sarcomaKaposi (Intron-A).
- Ngăn ngừa bệnh nhiễm cơ hội: Kháng sinh nếu nhiễm khuẩn, thuốc kháng virus nếu nhiễm virus.

Phòng ngừa

Sản xuất vaccin gặp rất nhiều trở ngại. Trước hết cũng do lý do nêu ở phần điều trị. Ngoài ra, do HIV có nhiều thay đổi các yếu tố bề mặt giúp hệ thống miễn dịch cơ thể nhận biết, nên vaccin chưa hiệu quả.

Các vaccin có bản chất là gp120 có khả năng tạo đáp ứng thể dịch, ức chế virus xâm nhập, cạnh tranh dung hợp màng bao, tương tác với tế bào bạch cầu.

Các vaccin genome virus là vaccin dùng các hệ vectơ khác nhau để biểu hiện *gag*, *pol*, *env*, *nef*. Các vaccin này kích thích đáp ứng CTL, có hiệu quả phòng vệ từng phần cho khỉ không bị nhiễm virus lai SIV-HIV (SHIV).

7.5. Virus gây ung thư

Có hai loại virus gây ung thư chính là virus ADN gây u có genome ADN sợi đôi và retrovirus có genome ARN sợi đơn. Hai loại virus này chuyển các tế bào bình thường thành tế bào ác tính theo cách khác nhau, cơ chế sao chép và nhiễm của chúng cũng khác nhau.

Các virus gây u thuộc họ retrovirus

Đặc tính chung

Các virus này không có tính độc tế bào, chúng thoát khỏi màng tế bào mà không giết các tế bào bị nhiễm. Có thể truyền ARN theo đường ngang như các tác nhân nhiễm kinh điển, hay truyền dọc theo dòng, hay từ mẹ qua đường cho con bú.

Có thể chia thành hai nhóm chính:

- Virus ung thư ác tính. Gây ung thư bạch cầu, u rắn, tiềm ẩn ngắn ở động vật. Làm chuyển thể các tế bào *in vitro*, thường gây sao chép khiếm khuyết.
- Virus gây ung thư bạch cầu hoặc các u lympho tế bào B, tiềm ẩn lâu. Không chuyển thể các tế bào *in vitro*. Sao chép cạnh tranh.

Virus nhiễm tế bào *in vitro* cho ba loại kết quả: (1) Tế bào chuyển thể và sản xuất virus, ví dụ các virus sarcoma không khiếm khuyết; (2) Tế bào chuyển thể và không sản xuất virus, ví dụ các virus sarcoma khiếm khuyết và (3) Tế bào không chuyển thể, sản xuất virus, ví dụ các virus leukemia.

Các retrovirus (cả gây u và không) đều dùng cơ chế sao chép ngược genome ARN của chúng thành ADN và hợp nhất ADN virus vào bộ gen tế bào chủ.

Khả năng gây bệnh

- Nhóm 1-Retrovirus chuyển thể cấp tính, gây bệnh do tạo thêm gen mới (*v-onc*) trong genome của tế bào chủ. Người ta đã biết nhiều *v-onc*, chúng mã hóa cho các chức năng khác nhau, đều là biến thể trội. Vì có nhiều *v-onc* khác nhau nên cơ chế sinh hóa chuyển thể tế bào của các virus cũng khác nhau.
- Nhóm 2-Retrovirus không mang *v-onc* (các virus gây ung thư bạch cầu và các u lympho). Gây u từ từ bằng cách chèn promoter, làm hoạt hóa sự biểu hiện các oncogen của tế bào gần vị trí chúng hợp nhất vào bộ gen tế bào chủ. Cũng có một số cơ chế khác như: tương tác và kích thích thụ thể erythropoietin (EPO) trong trường hợp các protein màng bao của virus leukemia Friend gây erythroleukemia, hay kích thích sự biểu hiện IL -2 của thụ thể IL -2 làm chuyển thể tế bào T của các HTLV (human T-lymphotropic virus).

Có hai loại HTLV -I và HTLV -II, đều liên quan đến ung thư máu và u lympho. Lây qua đường sinh dục và truyền máu bị nhiễm. Kết quả khảo sát ở Nhật cho thấy nếu nhiễm một mình HTLV thì không đủ để tạo nên ung thư.

Các virus ADN gây u

Trong các virus ADN, đến nay mới chỉ có ba nhóm thấy có liên hệ gây u ở người là virus Epstein -Barr (EBV), virus viêm gan B (HBV) và virus papilloma người (HPV).

EBV. Gây tăng đơn nhân nhiễm trùng và có liên quan đến hai loại ung thư là Burkitt's lymphoma châu Phi và ung thư vùng mũi hầu.

HBV. Gây ung thư tế bào nguyên phát. Nhiễm HBV mạn thường gây xơ gan. Người ta tìm thấy ADN của HBV và HbsAg trong những tế bào ác tính. Cơ chế là do ADN của HBV hợp nhất vào gây đột biến gen, làm hoạt hóa oncogen tế bào.

HPV. Virus nhỏ không bao, ADN sợi kép, hình khối 20 mặt, đường kính khoảng 55 nm. Gây bệnh u nhú biểu bì và mụn cóc. Có trên 60 loại huyết thanh của HPV. HPV -1 đến HPV -6 gây ra mụn cóc ở bàn chân, HPV-6 đến HPV -11 gây ra mụn cóc ở hậu môn – sinh dục và u nhú thanh quản. HPV -16 đến HPV -18 gây ung thư cổ tử cung.

Chẩn đoán. Dùng kỹ thuật sinh học phân tử.

7.6. Các prion

Từ "prion" do Prusiner đặt ra để chỉ protein nhiễm, là viết gọn của "protein infective agent". Prusiner đã được nhận giải thưởng Nobel năm 1997 cho việc đưa ra giả thiết prion và chứng minh chính xác sự hiện diện của nó. Khái niệm prion được quan tâm và tranh cãi vì đây là các tác nhân nhiễm bản chất protein, có khả năng tự sao chép, không có ARN hoặc ADN. Nhóm các bệnh thoái hóa nặng dần lên của CNS (bệnh não xốp bán cấp tính) gây bởi prion, từng được cho là do "các virus bất thường".

Prion là protein đơn (PrP, prion protein) tồn tại ở hai dạng đồng đẳng khác nhau. Trong mô khỏe là PrP^{C} (dạng tế bào bình thường) và PrP^{Sc} (dạng scrapie nhiễm). Hai dạng này có tính nhạy cảm khác nhau với protease: PrP^{C} (còn gọi là PrP^{sen}) là protein 33-35 kDa dễ bị protease K phân giải, trong khi PrP^{Sc} (hoặc PrP^{res}) tạo lõi 27-30 kDa (còn gọi là PrP27 -30) đề kháng với protease. Khi có chất tẩy, PrP^{C} tan, trong khi PrP27-30 polyme hóa thành các amyloid fibril (sợi dạng tinh bột).

Bệnh có thể được truyền bởi PrP^{Sc} tinh khiết, protein này chuyển PrP^{C} thành dạng PrP^{Sc} và dạng này chuyển các prion của tế bào thành dạng scrapie theo kiểu phản ứng dây chuyền. Các bệnh prion gồm scrapie, bệnh não xốp bán cấp ở bò ("bệnh bò điên") và bệnh não chồn vizon truyền được ở động vật, và bệnh Creutzfeldt -Jakob (CJD), hội chứng Gerstmann -Straussler-Scheinker (GSS) ở người. Các bệnh này có thời gian ủ bệnh rất dài (đôi khi tới 30 năm), nhưng một khi triệu chứng biểu hiện thì bệnh diễn tiến nhanh và hậu quả là chết.

Bảng 15.3. Bệnh não xốp bán cấp tính

Bệnh	Nguồn gốc được công nhận
Các bệnh ở người	
Kuru (bệnh run, chỉ ảnh hưởng tới dân của bộ tộc Fore ở Tân guinea –bị thoái hóa các tế bào hệ TKTW, đặc biệt vùng não có nhiệm vụ kiểm soát hoạt động)	Nhiễm do tục ăn thịt người (nay bị tuyệt chủng)
Bệnh Creutzfeldt -Jakob do dùng thuốc	Nhiễm từ hGH nhiễm, ghép giác mạc, các thiết bị y tế nhiễm, ...
Bệnh Creutzfeldt -Jakob biến thể	Nhiễm prion bò
Bệnh Creutzfeldt -Jakob không thường xuyên	Đột biến hoặc hoán chuyển tự phát PrP^{c} thành PrP^{Sc}
Bệnh tương tự Creutzfeldt -Jakob	Các đột biến tế bào mầm (germline) ở gen PrP
Bệnh Gerstmann -Straussler-Scheinker	Các đột biến tế bào mầm ở gen PrP
Mất ngủ gia truyền dẫn đến chết	Đột biến tế bào mầm ở gen PrP
Bệnh ở động vật	
Scrapie (cừu)	Nhiễm ở cừu dễ bị tổn thương có tính chất di truyền
Bệnh não xốp ở bò (gia súc)	Nhiễm do ăn thức ăn nhiễm prion
Bệnh não chồn vizon truyền được (chồn vizon)	Nhiễm prion từ cừu hoặc gia súc
Bệnh lãn mạn tính (hươu và nai)	Chưa biết

TỰ LƯỢNG GIÁ: Chọn câu trả lời đúng

1. Đặc tính **không** đúng cho virus:
   - a. Ký sinh nội bào bắt buộc
   - b. Tùy thuộc hoàn toàn vào bộ máy tổng hợp protein của tế bào chủ
   - c. Lấy nguồn năng lượng của tế bào chủ
   - d. Chứa ARN hoặc ADN (sợi đơn hoặc sợi đôi)
   - e. Là tế bào
2. Retrovirus có khả năng tạo dây ADN xoắn kép là nhờ enzym:
   - a. ATP synthetase
   - b. Reverse transcriptase
   - c. ADN polymerase
   - d. ADN synthetase
   - e. Helicase
3. Genome của virus có chứa:
   - a. Capsid
   - b. Envelop (bao)
   - c. ADN và ARN
   - d. ADN hoặc ARN
   - e. a, c
4. Virus có thể đi vào tế bào chủ theo các cơ chế sau:
   - a. Thực bào
   - b. Dung hợp
   - c. Chuyển vị
   - d. Bơm
   - e. Tất cả

5. Kiểu tác dụng trên tế bào chủ của virus nhiễm:

a. Nhiễm dai dẳng

b. Ly giải

c. Chuyển thể tế bào bình thường thành tế bào u

d. Tiềm ẩn

e. Tất cả

6. Phát hiện nhiễm virus **không** thể dùng:

a. Nuôi cấy trực tiếp trong phôi hoặc mô nuôi cấy

b. Quan sát bằng kính hiển vi điện tử

c. Quan sát bằng kính hiển vi phản pha

d. Tìm kháng thể kháng virus

e. Phản ứng cố định bổ thể

7. HIV có ái lực đặc biệt với tế bào nào của cơ thể người:

a. Bạch cầu

b. Đại thực bào

c. Lympho A

d. Lympho B

e. Lympho T

8. Virus gây viêm gan B có thể lây nhiễm qua đường:

a. Sinh dục

b. Máu

c. Hô hấp

d. Tiêu hoá

e. a và d

9. Virus dại thường gây tổn thương tại cơ quan:

a. Da

b. Màng nhày

c. Thần kinh thực vật

d. Thần kinh trung ương

e. Tất cả

10. AZT tác động lên HIV theo cơ chế:

a. Giảm sự nhân lên của HIV

b. Ngăn HIV bám vào tế bào lympho

c. Ngăn vi khuẩn gây bệnh cơ hội

d. Ức chế reverse transcriptase

e. Làm HIV mất vỏ

TÀI LIỆU ĐỌC THÊM

1. Madigan, Martinko and Parker. ***Brock Biology of Microorganisms***. 9th edition, 2000.
2. J. C. Sherris. *Medical Microorganisms*. 3rd edition, Prentice-Hall International Inc., 1994.

ĐÁP ÁN

Bài 2. Tế bào vi khuẩn

1 a	4 c	7 a	10 c
2 e	5 b	8 a	
3 e	6 d	9 c	

Bài 3. Dinh dưỡng và tăng trưởng của vi khuẩn

1 a	4 d	7 a
2 b	5 e	8 c
3 e	6 c	9 e

Bài 4. Sự trao đổi chất của vi sinh vật

1 a	4 d	7 c	10 c
2 b	5 e	8 b	
3 c	6 a	9 b	

Bài 5. Di truyền vi khuẩn

1 a	4 b	7 b	10 e
2 b	5 d	8 e	
3 d	6 c	9 c	

Bài 6. Sự liên hệ giữa vật chủ và vi khuẩn

1 b	2 e	3 b	4 c	5 a

Bài 7. Kháng nguyên - kháng thể

1d	3a	5b
2a	4c	

Bài 8. Phản ứng huyết thanh

1 d	3 d	5 b
2 c	4 c	

Bài 9. Phản ứng quá mẫn

1 d	3 d	5 e
2 a	4 c	

Bài 10. Sự đề kháng kháng sinh ở vi khuẩn

1 c	3 a	5 c
2 e	4 a	

Bài 11. Vi khuẩn đường ruột

1 b	4 c	7 b	10 d
2 c	5 c	8 c	
3 a	6 c	9 c	

Bài 12. Vi khuẩn gây bệnh lây qua đường sinh dục

1 c	3 e	5 e
2 c	4 a	

Bài 13. Vi khuẩn gây bệnh qua đường không khí

1 e	3 a	5 d
2 d	4 d	

Bài 14. Vi khuẩn gây bệnh ngoài da

1 a	3 e	5 a
2 b	4 c	

Bài 15. Virus gây bệnh

1 e	4 e	7 e	10 d
2 b	5 e	8 e	
3 d	6 c	9 d	

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

VI SINH HỌC

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

Biên tập: DS. PHƯƠNG THẢO

Sửa bản in: BS. HẢI YẾN

Trình bày bìa: CHU HÙNG

KT vi tính: HUỆ CHI

In 1.000 cuốn, khổ 19 x 27cm, tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.

Giấy phép xuất bản số: 23-2006/CXB/106– 271/YH

In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2006