

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

B GIÁO D C V À Ò T O
TR NG I H C M THÀNH PH H CHÍ MINH
KHOA CÔNG NGH SINH H C

Giáo trình
TH C T P VI SINH GÂY B NH

Biên so n: D ng Nh t Linh
Nguy n V n Minh

Tp.HCM, năm 2008
(Lôu hanh nơi b o)

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

M C L C

PH N 1: M T S K THU T C B N

Bài 1: Kh o sát tr c ti p

BÀI 2: K thu t kháng sinh

PH N 2: M T S K THU T NH DANH VI KHU N

BÀI 1: K thu t nh nhóm c u khu n

BÀI 2: K thu t nh danh ph y khu n t

BÀI 3: K thu t nh danh tr c khu n m xanh

BÀI 4: K thu t nh danh vi khu n th ng hàn *Salmonella typhi*

PH N 3: K THU T PHÂN TÍCH B NH PH M

BÀI 1: Ph ng pháp l y và g i b nh ph m

BÀI 2: Phân tích b nh ph m: các m u m và ch t d ch.

PH N 4: PH N NG HUY T THANH H C

BÀI 1: Ph n ng ng ng k t kháng nguyên - kháng th

BÀI 2: Ph n ng ng ng k t h ng c u HA (Hemagglutination test)

và Ph n ng ng n tr ng ng k t h ng c u HI (Hemagglutination Inhibition test)

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

PH N 1: M T S K THU T C B N

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Bài 1: KH O SÁT TR C TI P

I/ CÁC PH NG PHÁP KH O SÁT TR C TI P.

1. Soi t i

- Qua kính hi n vi th ng.

+ Soi t i không c n n n, là ph ng pháp soi t i qua kính hi n vi óng b t t quang, v i b nh ph m c t trong m t gi t n c mu i sinh lý trên m t lame kính, treo hay ép d i m t lamelle. Ph ng pháp n y dùng xem s di ng c a vi khu n.

+ Soi t i c n n n, là ph ng pháp soi t i qua kính hi n vi óng b t t quang v i b nh ph m c t trong m t gi t dung d ch màu làm n n nh dung d ch m c tàu; nigrosin; methylene blue, trên m t lame kính, ép d i m t lamelle. Ph ng pháp n y dùng xem nang vi khu n, hay tìm n m men có trong b nh ph m nh *Cryptococcus neoformans* trong d ch não tu .

- Qua kính hi n vi n n en hay o phase

+ Qua kính hi n vi n n en, m c ích thông th ng nh t là xem hình d ng và s di ng c a vi khu n có trong m t b nh ph m t trong m t gi t n c mu i sinh lý trên m t lame kính ép d i m t lamelle. Ph ng pháp này c dùng tìm xo n khu n giang mai, vi khu n leptospira, hay kh o sát s di ng vi khu n.

+ Qua kính hi n vi o phase, m c ích thông th ng nh t là xem nang vi khu n nh là *S. pneumoniae*, hay tìm n m men có trong b nh ph m nh *Cryptococcus neoformans* trong d ch não

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

tu .

2. Nhu m.

- Nhu m Gram, là ph ng pháp nhu m thông th ng nh t trong các phòng thí nghi m vi sinh. Ph ng pháp nhu m Gram cho phép xác nh c hình d ng, cách s p x p, và phân bi t vi khu n là thu c lo i Gram [+] hay Gram [-].
- Nhu m n Methylene blue ki m, là ph ng pháp hay c dùng nhu m kh o sát có s hi n di n c a vi khu n *Corynebacteria* hay không vì ph ng pháp n y cho phép nhu m vi khu n và các h t bi n s c có trong vi khu n.
- Nhu m kháng acid, là ph ng pháp hay c dùng nhu m và phát hi n các vi khu n kháng acid nh các *Mycobacteria*.
- Ph ng pháp nhu m hu nh quang, là ph ng pháp nhu m vi khu n b ng ph m màu hu nh uang, và ch áp d ng cho m t s tr ng h p nh nhu m hu nh quang rhodamin ph t àm tìm vi khu n lao.
- Ph ng pháp nhu m kháng th c hi u ánh d u men hay ánh d u hu nh quang, là các ph ng pháp phát hi n tr c ti p vi sinh v t mu n tìm có trong b nh ph m nh kháng th c hi u kháng nguyên vi sinh v t c ánh d u b ng men (phát hi n qua quan sát b ng kính hi n vi th ng) hay b ng hu nh quang (phát hi n qua quan sát b ng kính hi n vi hu nh quang)
- Các ph ng pháp nhu m khác, nh nhu m nang, flagella, spore...ch c dùng trong các tr ng h p c bi t.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

II. VAI TRÒ VÀ Ý NGHĨA CỦA KHẢO SÁT TRỰC TIẾP.

1. Cho kết quả rút ra từ sự quan sát chung cụ thể.

Có những kết quả khảo sát trực tiếp giúp bác sĩ lâm sàng và phòng thí nghiệm ngay lập tức nhận ra nguyên nhân gây bệnh vì sự chính xác gần như 99%, ví dụ:

- Kết quả khảo sát trực tiếp dịch não tuỷ thấy có song cầu Gram [-]; ngay lập tức nhận ra N. meningitidis, thấy song cầu Gram [+] hình mì giảo; ngay lập tức nhận ra S. pneumoniae, hay thấy trực khuẩn Gram [-] như; ngay lập tức nhận ra H. influenzae...
- Kết quả soi tìm ni mô ở mắt thấy có song cầu Gram [-]; ngay lập tức nhận ra N. gonorrhoeae...
- Kết quả soi tìm dịch não tuỷ thấy có nấm men có nang; ngay lập tức nhận ra nấm men C. neoformans...
- Kết quả khảo sát trực tiếp phết quẹt mắt cũng phát hiện C. trachomatis bằng phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang để chẩn đoán C. trachomatis đáng kể là kết luận bệnh nhân bệnh nhiễm khuẩn này.

Các kết quả như trên rất có giá trị giúp cho bác sĩ điều trị chọn lựa kháng sinh điều trị ban đầu, và giúp phòng thí nghiệm biệt lập chủng phân lập; nhận danh; và kháng sinh trong xét nghiệm cấy và phân lập tiếp theo.

2. Cho kết quả sự quan sát và ghi ý.

Rất nhiều kết quả khảo sát trực tiếp, nếu biệt lập đáng, bác sĩ lâm sàng sẽ có hướng điều trị ban đầu ngay như phòng thí nghiệm có hướng phân lập và nhận danh.

Ví dụ:

- Khảo sát trực tiếp ni mô trực tiếp, thấy có 1 vi khuẩn/quang trường

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

x100, có th ngh ngay là b nh nhân b nhi m trùng ti u và có th ch n l a kháng sinh i u tr b c u tùy theo hình nh Gram c a vi khu n hi n di n trong m u.

- Kh o sát ph t nhu m Gram m u m , hay abcess, hình nh vi khu n th y trong b nh ph m qua ph t nhu m Gram g i ý c tác nhân vi khu n gây b nh, nh ó bác s lâm sàng s có h ng i u tr ban u c ng nh phòng thí nghi m có h ng phân l p và nh danh....

3. Cho k t qu ánh giá m u có tin c y nuôi c y và phân l p hay không, và cho k t qu g i ý.

- Làm m t ph t Gram m u àm, quan sát quang tr ng x100, có th ánh giá m u tin c y hay không có th ti p t c th c hi n quá trình nuôi c y phân l p
- C ng qua ph t nhu m Gram m u àm, Mn u m u tin c y, có th ti p t c qua quang tr ng x1.000 quan sát hình nh Gram các vi khu n hi n di n, và k t qu n y s r t có giá tr g i ý cho phòng thí nghi m h ng phân l p vi khu n gây b nh, và bác s s có th có h ng dùng kháng sinh nào trong i u tr ban u.

4. Có nh ng tr ng h p m u không c n ph i làm kh o sát tr c ti p.

- M u quy t h ng, n u không có yêu c u tìm vi khu n b ch h u thì không c n thi t ph i làm kh o sát tr c ti p vì không có s khác bi t gi a m u không bnh v i m u b nh.
- M u phân, n u không có yêu c u tìm Campylobacter, V. cholerae thì không c n thi t ph i làm kh o sát tr c ti p.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

III/ CÁC PH NG PHÁP NHU M.

A/ NGUYÊN T C CHUNG KHI LÀM TIÊU B N NHU M.

1/ Ph t kính tiêu b n.

Lau nh tiêu b n s ch b ng gi y m m, h qua ền c n.

Dùng bút chì m ho c bút lông ghi tên m u, và v vòng tròn $\phi \approx 15\text{mm}$, m t d i lame kính ánh d u v t khu n phía trên lame.

t nóng que c y (tr c và sau khi thao tác), m nút bông, h nhanh mi ng ng nghi m.

Tr ng h p 1: m u nuôi c y trong canh dinh d ng, a u que c y vào mi ng ng nghi m (v n gi g n ng n l a), nhúng vào dung d ch canh c y, l y l vòng que c y. L y que c y ra, h nhanh mi ng ng nghi m và nút bông, y nút bông l i. Ph t canh khu n trên vòng que c y vào m t trên lam, gi a vòng tròn, d n u ra xung quanh.

Tr ng h p 2: m u nuôi c y trong th ch dinh d ng, nh gi t dung d ch NaCl 9‰ lên gi a vòng tròn (m t trên lam . Thao tác gi ng tr ng h p 1, nh ng dùng c nh vòng tròn c a u que c y t nh lên khu n l c vi khu n, r i t vào gi t NaCl 9‰ trên lam, d n m ng và u.

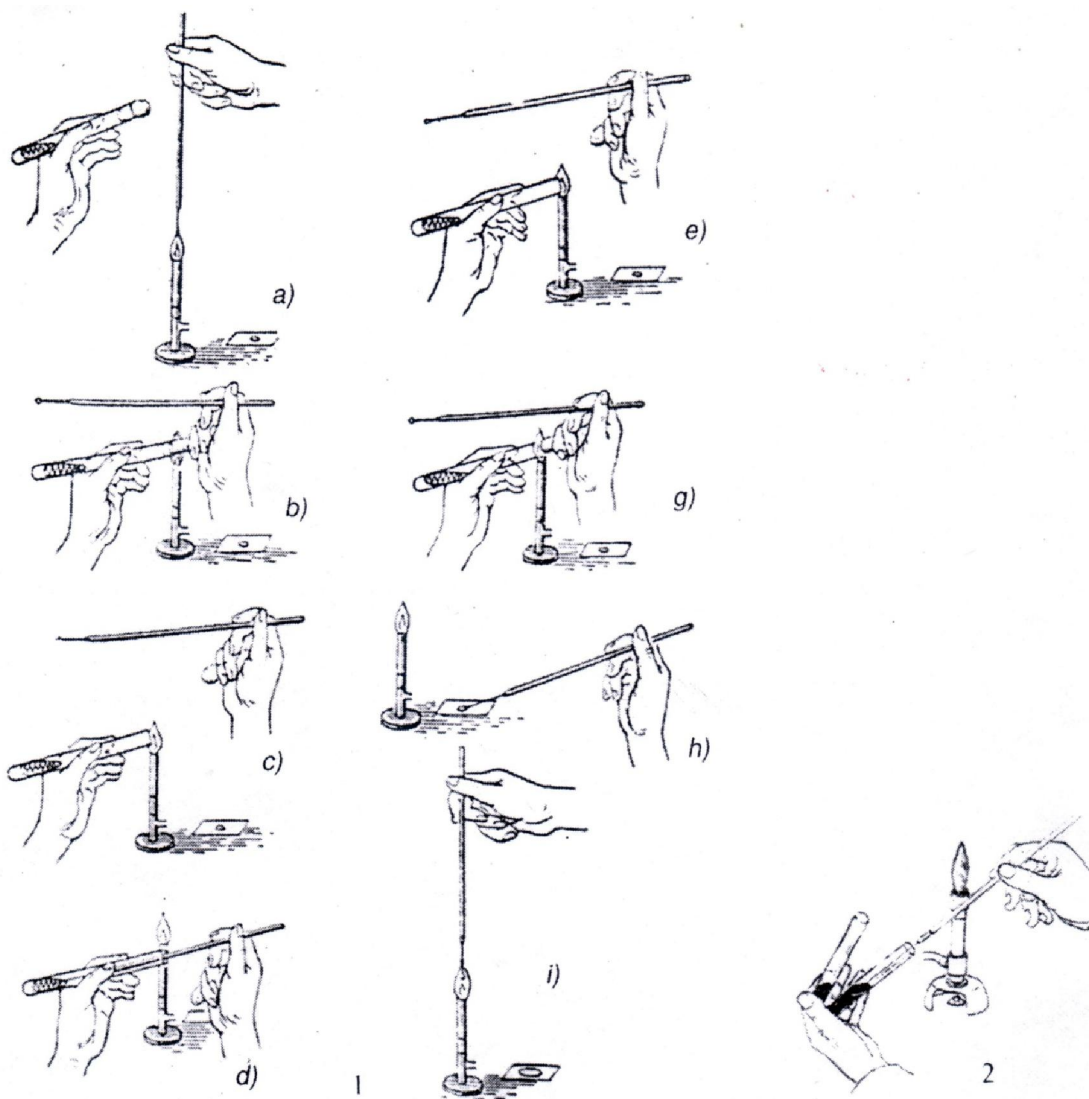
2/ C nh m u: M c ích gi t ch t vi khu n và làm cho vi khu n bám ch t vào lame. C nh m u b ng cách khô t nhiên.

Chú ý:

N u c nh không t t vi khu n s trôi i trong quá trình nhu m.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Khi c nh m u, ch h nhanh ch không t trên ng n l a.
Không c ch m vào thành khi a u que c y vào và ra
kh i ng nghi m vi khu n.



Hình 1: S th t ph t kính.

B/ CÁC PH NG PHÁP NHU M.

1/ Ph ng pháp nhu m gram (Christian Gram): Dùng phân
bi t vi khu n gram d ng và gram âm.

Ø Nguyên t c:

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Nhu m Gram, là ph ng pháp nhu m thông th ng nh t trong các phòng thí nghi m vi sinh. Ph ng pháp nhu m Gram cho phép xác nh c hình d ng, cách s p x p và phân bi t vi khu n là thu c lo i Gram[+] hay Gram[-].

Do s khác bi t v c u trúc vách t bào nên trong quá trình nhu m Gram, vi khu n Gram [+] s gi c ph c h p tím Gentian-iode không b t y màu b i alcool, trong khi vi khu n Gram [-] không gi c ph c h p màu này, do v y k t qu sau khi nhu m là vi khu n Gram [+] v n gi c màu tím c a gentian, còn vi khu n Gram [-] n màu h ng c a ph m màu safranin hay fuchsin.

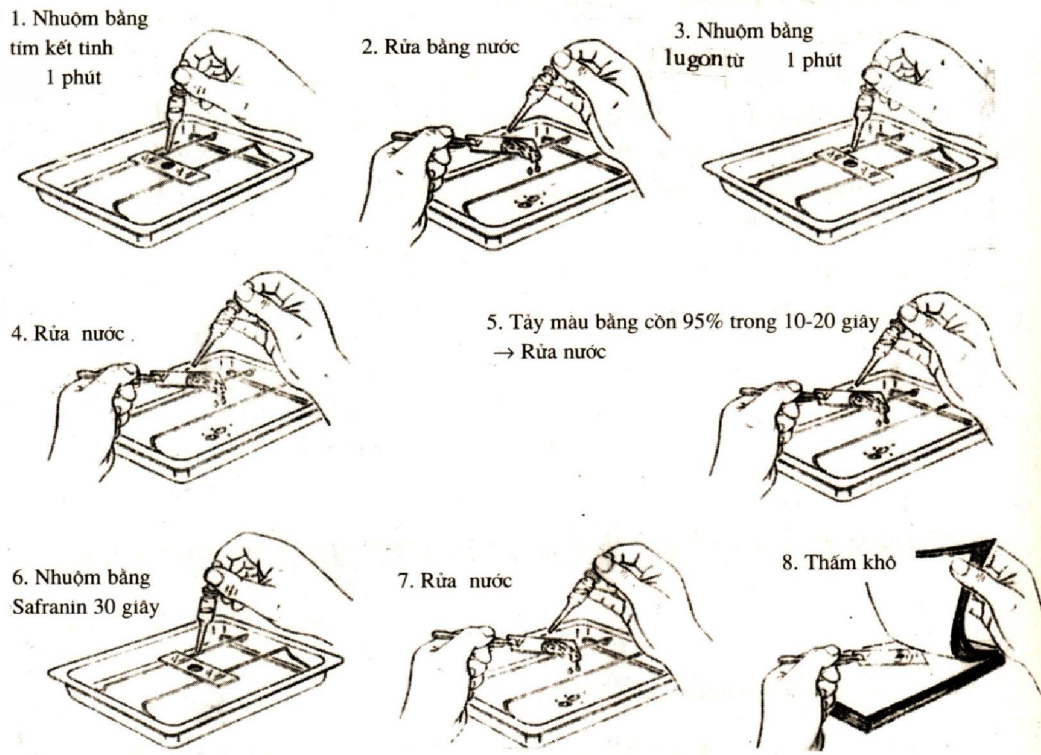
Ø Thao tác:

- t tiêu b n ã ph t kính và c nh m u lên thanh th y tinh ch U, trên thau nh a.
 - t mi ng gi y l c lên vòng ph t kính.
 - Nh dd Crystal violet th m t h t gi y l c. t 1 – 2 phút (n u vi khu n l y t canh l ng 2 phút, l y t th ch dinh d ng 1 phút). R a n c, th m khô.
 - T y c n 96° t 15 – 30 giây (t canh l ng t y 15 giây, t th ch dinh d ng t y 30 giây). R a n c, th m khô. *T y c n b ng cách nghiêng tiêu b n, cho c n ch y t t mép trên phi n kính. Quan sát mép d i cho n khi gi t c n v a m t màu tím.*
 - t mi ng gi y l c lên v t khu n, nh dung d ch Fuschin ki m loãng (ho c Safranin O), 1 phút. R a n c, th m khô.
 - Quan sát b ng v t kính d u, phóng i 1.000 l n.
- Vi khu n Gr⁺ b t màu tím Crystal violet, vi khu n Gr⁻ b t màu h ng Fuschin (Safranin O).

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Chú ý:

- Tr c m i l n nh thu c nhu m lên tiêu b n, ph i t mi ng gi y l c ph lên v t bôi.
- Sau m i l n nhu m u ph i r a n c và th m khô tiêu b n.



Hình 2: S th t nhuộm Gram.

Ø c k t qu :

- Quan sát ph t nhuộm Gram qua kính hi n vi, d i v t kính đ u, chúng ta s th y vi khu n Gram[+] n màu tím, còn vi khu n Gram[-] n màu h ng.
- Khi tr l i m t k t qu nhuộm Gram, ph i tr l i các chi ti t sau:
 - + Hình dáng vi khu n.
 - + Cách s p x p các vi khu n.
 - + Cách n màu c a vi khu n, t c là vi khu n Gram [+] hay Gram [-].

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

2/ Ph ng pháp nhuộm Ziehl – Neelsen (kháng acid): Dùng phân biệt vi khuẩn Lao và các vi khuẩn khác:

Ø Nguyên tắc:

Do tế bào vi khuẩn kháng acid có lớp vỏ sáp bao bọc nên khi nhuộm đặc biệt màu carbolfuchsin, đặc biệt này sẽ không bắt màu bằng dung dịch tẩy màu mạnh (acid, alcohol acid). Tuy nhiên đặc biệt này có thể thấm xuyên qua lớp vỏ sáp của vi khuẩn, có hai cách: (1) đun nóng đặc biệt nhuộm và dung dịch màu carbolfuchsin, nhờ đó mà carbolfuchsin thấm qua lớp vỏ sáp của vi khuẩn nhuộm màu vi khuẩn; đây là phương pháp nhuộm nóng Ziehl Neelsen. (2) Phương pháp thứ hai là phương pháp nhuộm lạnh còn gọi là phương pháp Kinyoun, trong phương pháp này người ta dùng dung dịch carbolfuchsin đặc, ngay khi pha dung dịch màu đặc này lên đặc biệt nhuộm và thời gian lâu, carbolfuchsin vẫn có thể thấm qua lớp vỏ sáp nhuộm màu vi khuẩn.

Ø Thao tác:

- Đặt tiêu bản đã pha đặc kính và cố định mẫu lên thành thủy tinh chịu U, đặt trên chậu nước.
- Đặt miếng giấy lọc lên vòng đặc kính.
- Nhúng dung dịch Fuchsin đặc thấm đặc biệt giấy lọc, đun nóng liên tục từ 5 – 7 phút.
- Trong khi đun đặc biệt nhúng chậu nhuộm liên tục giấy lọc luôn thấm đặc.
- Rửa nước, thấm khô.
- Tẩy cyan – acid đặc biệt khi không còn màu đặc biệt Fuchsin đặc (khoảng 30 giây).

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- R a n c, th m khô.
- Quan sát b ng v t kính d u, phóng i 1.000 l n.
- Vi khu n lao b t màu h ng Fuschin, vi khu n khác b t màu xanh methylen.

Chú ý:

Tr c m i l n nh thu c nhu m lên tiêu b n, ph i t mi ng gi y l c ph lên v t bôi.

Sau m i l n nhu m u ph i r a n c và th m khô.

Trong khi h nóng: dung d ch nhu m không c sôi, thu c nhu m ph i luôn th m t gi y, không c khô.

Không c nh m lãn gi a c n – acid (nhu m Ziehl Neelsen) và c n 96° (dùng nhu m Gram).

Ø c k t qu :

- Quan sát ph t nhu m kháng acid qua kính hi n vi, d i v t kính d u, tr c khu n kháng acid n màu cánh sen, còn vi
- khu n th ng c ng nh các n n khác nh t bào bi u mô hay b ch c u n màu xanh methylene blue.
- Khi tr l i m t k t qu nhu m kháng acid, không c k t lu n là d ng tính
M. tuberculosis mà ch tr l i có hi n di n tr c khu n kháng acid.
- Riêng i v i m u àm, c n quan sát 3 dòng, m i dòng quan sát kho ng 100 quang tr ng (QT) d u, ghi nh n k t qu theo b ng d i ây tr l i trên phi u tr l i k t qu :

Cách ghi k t qu quan sát ph t nhu m kháng acid m t

m u àm:

S tr c khu n kháng acid /s quang tr ng Cách ghi

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

k t qu

1-2/300 QT (3 dòng)	+/-
1-9/100 QT (1 dòng)	1+, s
trung bình/100 QT	
1-9/10 QT	2+, s trung
bình/10 QT	
1-9/1 QT	3+, s trung
bình/1QT	
>9/1 QT	4+, >9/QT

3/ Nhu m methylene blue ki m

Ø Nguyên t c.

Methylene blue khi c làm ki m hoá thì s nhu m c các h t bi n s c c a các tr c khu n *Corynebacteria*, c bi t là tr c khu n b ch h u. Do v y nhu m methylene blue ki m ngoài m c ích dùng nhu m n, nhu m n n sau khi nhu m kháng acid, còn có m c ích chính là nhu m các ph t b nh ph m qu t h u h ng phát hi n *Corynebacterium diphtheriae*.

Ø B thu c nhu m methylene blue ki m

nhu m methylene blue ki m, c n có chai thu c nhu m methylene blue ki m ch a trong chai s m màu, n p v n ch t, gi trong t i nhi t phòng.

Ø Ph ng pháp th c hi n.

- Tr c h t làm m t ph t m ng b nh Ph m hay vi khu n trên lame kính, khô t nhiên, r i sau ó g n trên lame b ng cách h nhanh qua ng n l a èn c n hay èn bunsen 3 l n. L u ý là ch h nh trên ng n l a lame ch m lên v a ph i ch không làm lame b quá nóng vì nh v y s làm bi n th hình

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

d ng vi khu n.

- t lame trên giá nhuộm, cho vài giọt thuốc nhuộm methylene blue ki m ph trùm lên ph t vi khu n, yên trong 1 phút. Sau ó c m lame lên và r a s ch màu th a dính trên lame d i m t v òi n c máy ch y r t nh .
- Th m khô lame b ng cách ép lame gi a 2 t gi y th m. khô lame hoàn toàn trong không khí. Sau ó nh m t gi t d u soi kính lên ph t nhuộm và quan sát qua kính hi n vi, tr c h t v t kính x10 tìm vùng ph t b nh ph m, sau ó xoay sang v t kính x100 (v t kính d u) quan sát hình thái và cách n màu c a vi khu n.

Ø c k t qu .

T bào vi khu n b t màu xanh bi n nh t, các h t bi n s c b t màu tím en.

BÀI 2: K THU T KHÁNG SINH

- Kháng sinh là ph ng pháp tìm nh y c m c a vi khu n v i các lo i kháng sinh.
- Th nghi m kháng sinh c ch nh th c hi n trên b t c vi khu n nào gây ra ti n trình nhi m trùng nh m m b o c kháng sinh tr li u m t khi không th oán tr c c m t cách chính xác nh y c m c a vi khu n i v i kháng sinh n u ch đ a vào nh danh vi khu n.
- Th nghi m kháng sinh th ng c th c hi n khi tác nhân vi khu n c coi là thu c các loài có kh n ng kháng c các kháng sinh thông d ng.
- Có m t s vi khu n ng i ta có th oán tr c c nh y c m v i kháng sinh và có th dùng c kháng sinh i u tr theo kinh nghi m. Không c n thi t làm kháng sinh khi nhi m trùng ó gây ra do vi khu n ã c bi t là luôn luôn nh y c m v i kháng sinh i u tr .
- Kháng sinh r t quan tr ng trong vi c nghi n c u d ch t h c kháng thu c và trong nghi n c u các kháng sinh m i.
- Có nhi u ph ng pháp th kháng sinh , ph m vi bài này ta kh o sát 2 ph ng pháp:
 - Ph ng pháp khu ch tán kháng sinh trên th ch Kirby Bauer.
 - Ph ng pháp pha loãng kháng sinh liên ti p (Ph ng pháp MIC tìm n ng c ch t i thi u).

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

I. PH NG PHÁP KIRBY BAUER.

1. Nguyên t c.

Kháng sinh c t m vào a gi y theo n ng cho t ng lo i. Kháng sinh s khu ch tán chung quanh m t th ch môi tr ng nuôi c y. ng kínhvòng vô khu n

2. Chu n b v t li u.

2.1 a kháng sinh.

- Ch n l a các kháng sinh thích h p nh t th nghi m và phức trình k t qu là quy t nh c a phòng thí nghi m vi sinh lâm sang có th tham v n v i các bác s , khoa d c, các b ph n d c chính và y ban ki m soát nhi m trùng c a b nh vi n.
- Có r t nhi u lo i kháng sinh. Tuy nhiên không th th nghi m kháng sinh h t cho t t c các lo i mà c n ph i có s l a ch n.
- Các tiêu chu n l a ch n kháng sinh th nghi m c h ng d n chi ti t b i y ban Qu c gia v tiêu chu n c a các phòng thí nghi m t i M . Các tiêu chu n chính:
 - + Ch n kháng sinh i di n cho nhóm có cùng ph ho t ng.
 - + Tùy thu c vào lo i vi khu n th nghi m.
 - + Tùy thu c vào v trí nhi m khu n.
 - + Tùy theo chi n l c và chính sách s d ng kháng sinh t ng vùng, t ng a ph ng.
- a kháng sinh là nh ng a gi y có ng kính 6mm, c t m dung d ch kháng sinh v i n ng tiêu chu n.
- Các a kháng sinh c óng gói m b o i u ki n không hút m. Các a kháng sinh nên c l u tr nh sau:

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- + Các l ch a a kháng sinh c gi 8⁰C hay th p h n hay gi ông -14⁰C hay th p h n cho n khi dùng.
- + Nên l y các l ch a a kháng sinh còn óng kín ra kh i t l nh trong kho ng 1- 2h nhi t trong l b ng v i nhi t phòng thí nghi m tr c khi m n p. Thao tác này nh m tránh các gi t n c ng l i trên a do khí m ti p xúc v i nhi t l nh c a a.
- + Khi không s d ng, d ng c phân ph i a có ch a a kháng sinh ph i luôn luôn c gi trong t l nh.
- + Ch s d ng các a còn h n dùng, lo i b các a kháng sinh quá h n.

2.2 Môi tr ng c b n th c hi n kháng sinh

Th ch Mueller Hinton là môi tr ng t t nh t th nghi m kháng sinh th ng qui (i v i vi khu n d m c) vì các lý do sau:

- + Cho k t qu có tính l p l i cao khi th nghi m kháng sinh v i các lo t môi tr ng.
- + Ít ch t c ch i v i sulfonamide, trimethprim và tetracycline.
- + Thích h p t ng tr ng cho h u h t các vi khu n d m c.
- + M t s l ng l n các d li u và kinh nghi m là có t kháng sinh th c hi n trên môi tr ng này.

i v i các vi khu n khó m c thì tiêu chu n môi tr ng ph i c bi n i cho phù h p, b sung các ch t i v i m i lo i vi khu n.

VD:

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- i v i các loài Haemophilus ph i ch n môi tr ng th nghi m là HTM (Haemophilus Test Medium).
- i v i vi c phát hi n ch ng Staphylococci kháng Methycilline thì môi tr ng c n thêm 2% NaCl, ch nh pH môi tr ng t 7.2 -7.4.
- i v i vi c phát hi n ch ng *Pseudomonas aeruginosa* i v i các kháng sinh trong nhóm Aminoglycosides c n them Ca^{++} và Mg^{++} .

Pha th ch MHA và nh ng i u c n l u ý:

- + c pha t môi tr ng khô có s n trên th ng m i, theo ch d n c a nhà s n xu t.
- + c ngu i t 45 – 50⁰C trong máy cách th y (b i u nhi t) ngay sau khi h p t.
- + môi tr ng v a pha và ngu i vào các h p Petri ph i th t ph ng áy và Petri này c t trên m t th t ph ng th ch có b dày ng nh t kho ng 4mm
- + Nên ngu i môi tr ng nhi t phòng thí nghi m, n u ch a s d ng trong ngày nên gi trong t l nh t 2 – 8⁰C và c b c trong bao plastic h n ch s m t n c. Các h p th ch ch nên c dùng trong vòng 1 tu n k t ngày pha.
- + M t m u i di n cho các h p th ch ã pha nên c ki m tra ngo i nhi m b ng cách mang 35- 35⁰C/ 24h.
- + N u tr c khi dùng, trên m t th ch quá m thì nên h p th ch t m 35⁰C hay trong bu ng khí l u cho n khi khô m t (kho ng 10- 30 phút)

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

+ Khi tr i vi khu n, m t th ch nên m nh ng không có
n c ng trên m t và trên n p y.

2.3 Dung d ch chu n c 0.5 McFarland

- chu n m c hóa c c a vi khu n th nghi m ph i t
 10^8 t bào/ml, nên dùng huy n d ch $BaSO_4$ t ng ng
c 0.5McFarland hay m t huy n d ch t ng ng th y
b ng m t th ng (huy n d ch latex).

- Pha c chu n d a trên nguyên t c ph n ng gi a :



- Có 2 cách pha:

CÁCH 1: Ch n 10 ng nghi m cùng ch t li u pha dung d ch
chu n nh sau:

Th t	H_2SO_4 1%	BaCl 1%	S l ng vi khu n x 10^6
1	9,9	0,1	300
2	9,8	0,2	600
3	9,7	0,3	900
4	9,6	0,4	1200
5	9,5	0,5	1500
6	9,4	0,6	1800
7	9,3	0,7	2100
8	9,2	0,8	2400
9	9,1	0,9	2700
10	9,0	1	3000

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

ng c chu n 0.5 McFarland có c t ng ng
v i s l ng vi khu n là 10^8 t bào/ml thì ta l y ng s l ã pha
t ng ng v i $3 \cdot 10^8$ t bào/ml pha loãng thêm 3 l n.
Cách pha: dùng ng nghi m s l, l c u, hút l y 4ml pha vào 8ml
n c c t vô khu n, tr n , b 2 ml, y kín ã dùng ng này làm
ng c chu n 0.5McFarland.

CÁCH 2: Pha dung d ch d tr :

a. Dung d ch d tr A : (0,048 M)

BaCl₂ . 2H₂O :11.75g

N c c t v a :1000ml

b. Dung d ch d tr B : (0,36N)

H₂SO₄ :1%

c. Dung d ch chu n c

Dung d ch A : 0,5ml

Dung d ch B : 99,5ml

m chính xác c a c chu n nên c xác nh
b ng quang ph k o h p th . c chu n 0.5McFarland
ph i o h p th b c sóng 625nm t 0.08 n 0.1.

- Nên phân ph i 4 -6ml huy n d ch BaSO₄ vào các tube n p v n
có cùng c v i tube pha d ch khu n th nghi m
- Các tube này nên v n kín n p và gi trong t i nhi t
phòng thí nghi m
- Tr c khi dùng, ph i l c m nh tube ch a c chu n t
c c ng nh t. N u có l n c n ph i thay ng này
b ng ng khác.
- N u s d ng ng c chu n này thì hàng tháng ph i thay tube
c chu n m i hay ph i nh l i m c a nó.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

3. Quy trình th c hi n th nghi m khu ch tán.

3.1 Chu n b d ch khu n th nghi m.

Có 2 ph ng pháp.

- Ø Ph ng pháp t ng sinh pha huy n d ch vi khu n
- Trên m t th ch phân l p thu n khi t, ch n ít nh t t 3 – 5 khóm vi khu n gi ng nhau và tách r i c y truy n vào 4-5ml môi tr ng l ng thích h p nh : NB, TSB.
 - Canh c y l ng 35⁰C cho n khi t c hay h n c chu n 0.5McFarland (th ng t 2- 6h). Huy n d ch vi khu n nh v y ch a kho ng 1- 2 x 10⁸ t bào/ml.
 - Dùng môi tr ng l ngay n c mu i sinh lý vô khu n i u ch nh c c a canh c y vi khu n ang t ng tr ng này n c chu n 0.5McFarland. th c hi n c chính xác b c này thì có th dùng quang k hay nhìn b ng m t th ng b ng cách dùng ánh sang so sánh tube ch a vi khu n v i tube c chu n 0.5McFarland trên m t t m bìa c ng có k nh ng v ch en
- Ø Pha huy n d ch vi khu n tr c ti p t khóm vi khu n.
- C ng thu n ti n nh ph ng pháp t ng sinh, có th pha huy n d ch vi khu n trong môi tr ng l ng hay trong n c mu i sinh lý tr c ti p t các khóm vi khu n m c trên m t th ch nuôi c y ã 18- 24h (nên dùng môi tr ng th ch không ch n l c nh BA). i u ch nh huy n d ch vi khu n t c chu n 0.5McFarland nh ã trình bày ph n trên.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- ây là cách c ch n th nghi m kháng sinh các vi khu n khó m c nh : *Haemophilus spp.*, *N.gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* và th nghi m vi khu n *Staphylococci* kháng Methycilline hay Oxacilline.

3.2 Tr i d ch khu n trên m t th ch.

- Trong vòng 15 phút sau khi pha huy n d ch vi khu n, dùng 1 que gòn vô khu n nhúng vào huy n d ch r i l y lên ép và xoay nh que gòn trên thành ng nghi m. Thao tác này s lo i b c l ng huy n d ch vi khu n th a kh i que gòn.
- Tr i y vi khu n t que gòn lên m t th ch MHA ã hong khô tr c ó. Tr i b ng cách c y v ch que gòn lên m t th ch, xong l i xoay m t th ch 60⁰ r i c y v ch l l n n a, ti p t c nh v y m b o tr i y c vi khu n lên m t th ch
- cho khô m t tr c khi t a kháng sinh lên m t th ch.
- L U Ý: Tránh tr i m m c y quá dày. Tuy t i không bao gi tr i vi khu n t canh c y vi khu n qua êm không pha loãng hay không úng c chu n.

3.3 t a kháng sinh lên m t th ch ã tr i vi khu n.

- Xác nh b a kháng sinh nào nên t lên m t th ch. Khi t ph i ép nh m i a kháng sinh m b o chúng ti p xúc hoàn toàn v i m t th ch. t a kháng sinh b ng tay hay b ng d ng c phân ph i a u ph i m b o các tâm a kháng sinh không g n nhau d i 24mm và cách mép h p Petri 2.5 -3cm. Th ng v i h p th ch Ø 150mm không t quá 12 a, Ø90mm không t quá 7 a.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- Kháng sinh khu ch tán ngay sau khi a kháng sinh ch m m t th ch, vì v y không nên d i ch các a kháng sinh sau khi ã t lên m t th ch.
- Trong vòng 15 sau khi ã t các a kháng sinh, ph i s p h p th ch (áy trên, n p d i) 35⁰C. Ngo i tr vi khu n *Haemophilus spp.* và *S. pneumoniae* thì không h p th ch trong khí tr ng nhi u CO₂ vì các tiêu chu n bi n lu n k t qu u c hình thành t i u ki n bình th ng và ngoài ra CO₂ còn có th làm thay i áng k ng kính các vòng vô khu n.

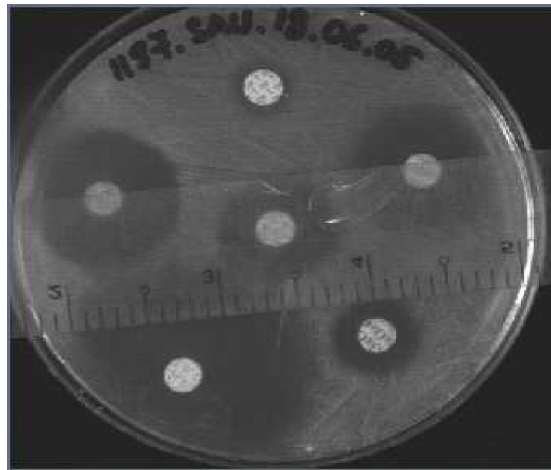
3.4 c và bi n lu n k t qu

- Sau khi 16 – 18h, c k t qu các h p th ch. N u m t th ch c tr i vi khu n úng cách , úng c chu n, vi khu n s m c thành nh ng khóm m n ti p h p nhau và vòng vô khu n s là m t vòng tròn ng nh t. N u vi khu n m c thành nh ng khóm riêng l thì m m c y quá loãng ã ph i làm l i th nghi m
- o ng kính vòng vô khu n là m t vòng, k c ng kính c a a kháng sinh, hoàn toàn không th y vi khu n m c và th y c b ng m t th ng
- o ng kính vòng vô khu n thành mm tròn , b ng compa tr t hay th c k tr t hay th c thi t k dành riêng cho m c ích này b ng cách áp th c lên m t sau c a áy h p th ch và r i b ng ánh sáng ph n chi u
- Chu vi vòng vô khu n là vùng mà th y b ng m t th ng , không th th y vi khu n m c. Không c n ý n các khóm vi khu n li ti hay s t ng tr ng nh c a vi khu n bên trong

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

vòng vô khu n mà ch có th th y b ng kính lúp. Tuy nhiên, các khóm vi khu n này c n ph i c c y, nh danh và th nghi m l i

- Bi n lu n ng kính vòng vô khu n đ a theo tiêu chu n NCCLS và ghi nh n k t qu vi khu n nh y c m hay trung gian hay kháng i v i kháng sinh th nghi m.



II. PH NG PHÁP MIC (Minimum Inhibitory Concetration)

- Ph ng pháp Kirby Bauer ch cho bi t k t qu theo nh tính. Mu n bi t n ng c ch t i thi u là bao nhiêu thì ta ph i làm kháng sinh theo ph ng pháp pha loãng liên ti p
- Kháng sinh có th c pha loãng theo 3 cách:
 - + M t dãy ng nghi m liên ti p
 - + Trên các gi ng nh a c ng
 - + Trên các a Petri ch a th ch MHA

Trong bài th c hành này ta pha loãng kháng sinh trong m t dãy ng nghi m.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- + Ph ng pháp này ch ti n hành c các phòng xét nghi m có i u ki n trang thi t b , b t kháng sinh chu n, không khí s ch,...m c ích là xác nh n ng c ch t i thi u, t ó có th tìm ra n ng t i thi u di t khu n (n ng kháng sinh th p nh t gi t ch t vi khu n).
- + Ng i ta dùng ph ng pháp này cho nh ng nghiên c u chuyên sâu v nh y c m c a vi khu n i v i kháng sinh ho c ki m ch ng l i ph ng pháp Kirby Bauer.

1. Nguyên t c.

D a trên s t ng quan gi a n ng pha loãng c a kháng sinh i v i s t ng tr ng c a vi khu n trong m i n ng kháng sinh khác nhau mà ta xác nh c n ng c ch t i thi u c a kháng sinh có kh n ng ng n ch n s t ng tr ng c a vi khu n

2. Chu n b v t li u.

2.1 Chu n b kháng sinh pha loãng có n ng 200µg/ml.

có th pha loãng kháng sinh chu n có n ng 200µg/ml thì tu thu c vào lo i b t kháng sinh tan trong dung d ch nào phù h p thì ta ch n dung d ch ó làm dung d ch chu n pha loãng kháng sinh có n ng theo yêu c u.

2.2 Chu n b vi khu n th nghi m.

Vi khu n th nghi m có s l ng c n t là $5 \cdot 10^5$ t bào/ml c pha nh sau:

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- + Dùng vi khu n th nghi m c c y vào canh tr ng m c t t. i u ch nh c c a canh c y vi khu n t ng ng v i c chu n 0,5McFarland, có ngh a là l ng vi khu n t 10^8 t bào/ ml.
- + Pha loãng ng vi khu n 10^8 t bào/ ml sang ng có n ng 5.10^5 t bào/ml nh sau:
- + Pha loãng 1/100 ng vi khu n ng vi khu n 10^8 t bào/ ml v i môi tr ng NB hay n c mu i sinh lý 0.85%. Nh v y ta có ng t 10^6 t bào/ml.
- + Hút 1 ml vi khu n 10^6 t bào/ml cho vào 1ml kháng sinh ã pha loãng ta s có m m c y cu i cùng t 5.10^5 t bào/ml.

3. Quy trình th c hi n th nghi m.

- ánh s ng nghi m t 1 n 10.
- Cho vào các ng nghi m t 2 –10 m t l ng là 0.5ml môi tr ng l ng NB.
- Pha loãng kháng sinh liên ti p theo t l $\frac{1}{2}$ t ng s 2 n ng s 9, ng 10 gi nguyên (không có kháng sinh).
- Cho vào các ng nghi m t 1 n 10 m t l ng là 0.5ml huy n d ch vi khu n.
- L c u ng nghi m và trong t m $37^0C/ 18- 24h$.

c t ng d n h ng v \longrightarrow

ng 10

ng nghi m	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MT	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

NB(ml)										
K/sinh 200µg/ml (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
Hút b 0.5ml t ng s 9										
VK 5.10^5 t bào/ml (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
N ng k/s	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	0

4. c k t qu .

- ng 10 : c do có vi khu n m c và không có kháng sinh.
- ng 1: vi khu n không m c d i tác d ng c a kháng sinh.
- Có m t lo t ng c h ng v ng s 10 và m t lo t ng trong h ngv ng s 1
- Quan sát 10 ng nghi m, tìm xem ng nào là ng trong cu i cùng và tr l i k t qu n ng kháng sinh ng ó (n v tính là µg/ml) và vi khu n nh y c m n ng bao nhiêu.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

PH N 2: M T S K THU T NH DANH
VI KHU N

BÀI 1: K THU T NH DANH NHÓM C U KHU N

I. T C U KHU N *STAPHYLOCOCCI*.

1. N I C TRÚ VÀ TÍNH GÂY B NH.

Ø T c u khu n có h n 20 lo i c phân thành 2 nhóm l n: **coagulase d ng** và **coagulase âm**. Trong s này *Staphylococcus aureus* thu c lo i **coagulase d ng**- tác nhân chính gây b nh cho ng i và th ph m c a nhi u nhi m khu n tr m tr ng. Nh ng lo i **coagulase âm** th ng là nh ng vi khu n th ng trú. Tuy nhiên, *S.epidermidis* ôi khi gây nhi m khu n máu, viêm n i tâm m c, *S.saprophyticus* có th gây nhi m khu n ng tí u, *S. homonis*, *S. haemolyticus* và *S. simulans* c ng có th gây b nh cho ng i.

Ø Có 3 lo i t c u khu n quan tr ng th ng g p nh t.

1.1 *Staphylococcus aureus* (nhóm coagulase d ng).

Ø Có th gây các b nh nhi m khu n thông th ng nh m n, m n nh t, m n b c, viêm l tai và xoang m i n nhi m khu n tr m tr ng nh s ng ph i, nhi m khu n huy t, viêm màng não, viêm màng trong tim và nhi m khu n ng tí u.

Ø Ngoài ra, m t s lo i t c u nhi m khu n vào th c n, khi vào c th s ti t ra c t ng ru t (Enterotoxin) làm ng i n b nôn m a, tiêu ch y d d i ngay sau vài gi .

1.2 *Staphylococcus epidermidis* (nhóm coagulase âm).

Th ng là tác nhân các b nh nhi m khu n, do t c u có t i b nh vi n gây ra. Ch ng h n nh nhi m khu n do dùng các lo i ng thông (catheter) a vào các n i sâu bên trong c th .

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

1.3 *Staphylococcus saprophyticus* (nhóm coagulase âm).

Th ng g p trong các b nh nhi m khu n ng ti u ph n .
M t s ng i nhi m t c u khu n nh ng không bi u hi n ra
các tri u ch ng b nh, ó g i là ng i lành mang m m b nh.

2. C TÍNH HÌNH TH VÀ NHU M.

Hình c u, ng kính kho ng 1µm, có th ng riêng l , ôi hay chu i ng n (nh ng không quá 4-5 t bào). Cách s p x p ch y u là thành hình chùm nho không u nhau. Vi khu n b t màu nhu m Gram d ng, nh ng có th bi n thành Gram âm trong l a c y già. Không di ng, không bào t ..

3. C TÍNH NUÔI C Y.

Ø *Staphylococci* m c d dàng trên h u h t các lo i môi tr ng nuôi c y, trong i u ki n hi u khí, vi hi u khí và k khí tu nghi. Nhi t thích h p nh t là 37⁰C, nh ng nhi t phòng (20- 25⁰C) là t t nh t vi khu n ti t s c t . Sau khi t 18- 24h, các khúm vi khu n có hình tròn, ng kính kho ng 2-4mm, l i, biên u, c, có màu t tr ng, vàng chanh n vàng kim. (*S. aureus* cho khóm màu vàng, *S. epidermidis* cho khóm xám hay tr ng, *S. citreus* cho khóm màu vàng chanh). Màu bi n m t khi c y y m khí và xu t hi n khi cho l a c y ti p xúc v i không khí.

Ø *Staphylococci* t ng tr ng c trên môi tr ng ch a 7.5% NaCl.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Ø Trên th ch máu BA, g c gây b nh th ng cho ph n ng tiêu huy t.

4. C TÍNH SINH HÓA VÀ NH DANH.

4.1 Kh o sát hi n vi

Nhu m Gram tr c ti p t b nh ph m hay t l a c y.

4.2 Th nghi m Catalase

- M c ích: ch n oán phân bi t khóm vi khu n *Staphylococci* v i khóm vi khu n *Streptococci* và *Pneumococci*.

- Nguyên t c: *Staphylococci* có emzyme catalase s phóng thích O_2 t n c oxy già t o hi n t ng s i b t.

- K thu t: theo giáo trình VSCS

- K t qu :

+ Hi n t ng s i b t x y ra ngay l p t c sau khi H_2O_2 ti p xúc v i vi khu n à catalase d ng à cocci này là *Staphylococci*.

+ Không có hi n t ng s i b t à catalase âm à cocci này là *Streptococci*

Chú ý: Khi l y vi khu n trên môi tr ng th ch máu nên l y ph n trên khóm vi khu n, tránh khuyên c y ti p xúc v i th ch máu vì h ng c u có kh ng n ng làm ph n ng d ng tính gi .

Khuyên c y b ng platin s cho ph n ng d ng tính gi .

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh



4.3 Th nghi m Coagulase.

- M c ích: dùng nh danh *Staphylococcus aureus*, và phân bi t v i các *Staphylococci* khác.

- Nguyên t c: enzyme coagulase hi n di n d i 2 d ng : coagulase liên k t và coagulase t do, c phát hi n khi g p huy t t ng gây nên hi n t ng l n c n ho c ông c huy t t ng. Vi khu n *S. aureus* có ch a enzyme coagulase có kh n ng làm ông huy t t ng.

- K thu t:

+ Trên lame: tìm coagulase liên k t.

+ Trong ng nghi m: tìm coagulase t do (k thu t trên ng nghi m cho k t qu ch c ch n h n).

L y 3 ng nghi m vô trùng lo i 10 x 75mm, ghi trên ng nghi m l n l t là U (Unknown), C⁺ (coagulase d ng chu n), C⁻ (coagulase âm chu n).

Cho 0.5ml huy t t ng th vào m i ng.

Cho 1 vòng que c y vi khu n c n xác nh ã c y 24h vào ng U.

Cho 0.1ml canh c y l ng c a g c vi khu n chu n có coagulase d ng vào ng C⁺

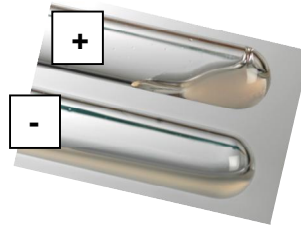
Cho 0.1ml n c mu i sinh lý vô trùng vào ng C⁻.

t t t c 3 ng vào t m 37⁰C, h u h t các ch ng *S. aureus* coagulase d ng u làm ông huy t t ng trong vòng 4gi .

- K t qu : sau 1- 4h n u có hi n t ng ông c huy t t ng à coagulase d ng à *S. aureus* có kh n ng làm ông huy t t ng.

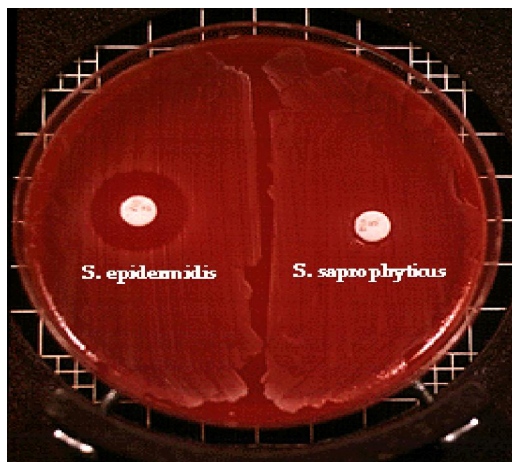
Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Chú ý: n u sau 4h không quan sát th y hi n t ng ông c huy t t ng thì ph i l i nhi t phòng thí nghi m và c k t qu sau 18gi .



4.4 Th nghi m kháng Novobiocin.

- M c ích: dùng nh danh *Staphylococcus saprophyticus*.
- Nguyên t c: *S. saprophyticus* có kh n ng kháng v i Novobiocin.
- K thu t: th c hi n gi ng k thu t kháng sinh ph ng pháp khu ch tán trên th ch (Bài 6), dùng a kháng sinh Novobiocin (Nv) có t m v i hàm l ng 5µg t lên trên m t th ch, 37⁰C trong 18-24h.
- K t qu :
 - + Nh y c m: ng kính vòng vô khu n > 16mm.
 - + kháng: ng kính vòng vô khu n < 16mm à *S. saprophyticus*.

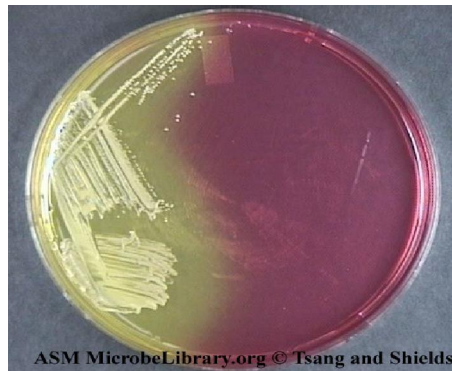


Novobiocin Sensitivity Discs

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

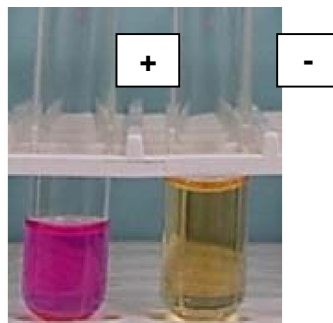
4.5 Kh n ng t ng tr ng và lên men trên môi tr ng MSA (Chapman).

Các lo i t c u khu n u t ng tr ng c trên môi tr ng MSA ch a 7.5% NaCl. Riêng g c gây b nh *S. aureus* do có kh n ng lên men c trên môi tr ng Mannitol nên s t o m t vùng màu vàng bao quanh khóm vi khu n.



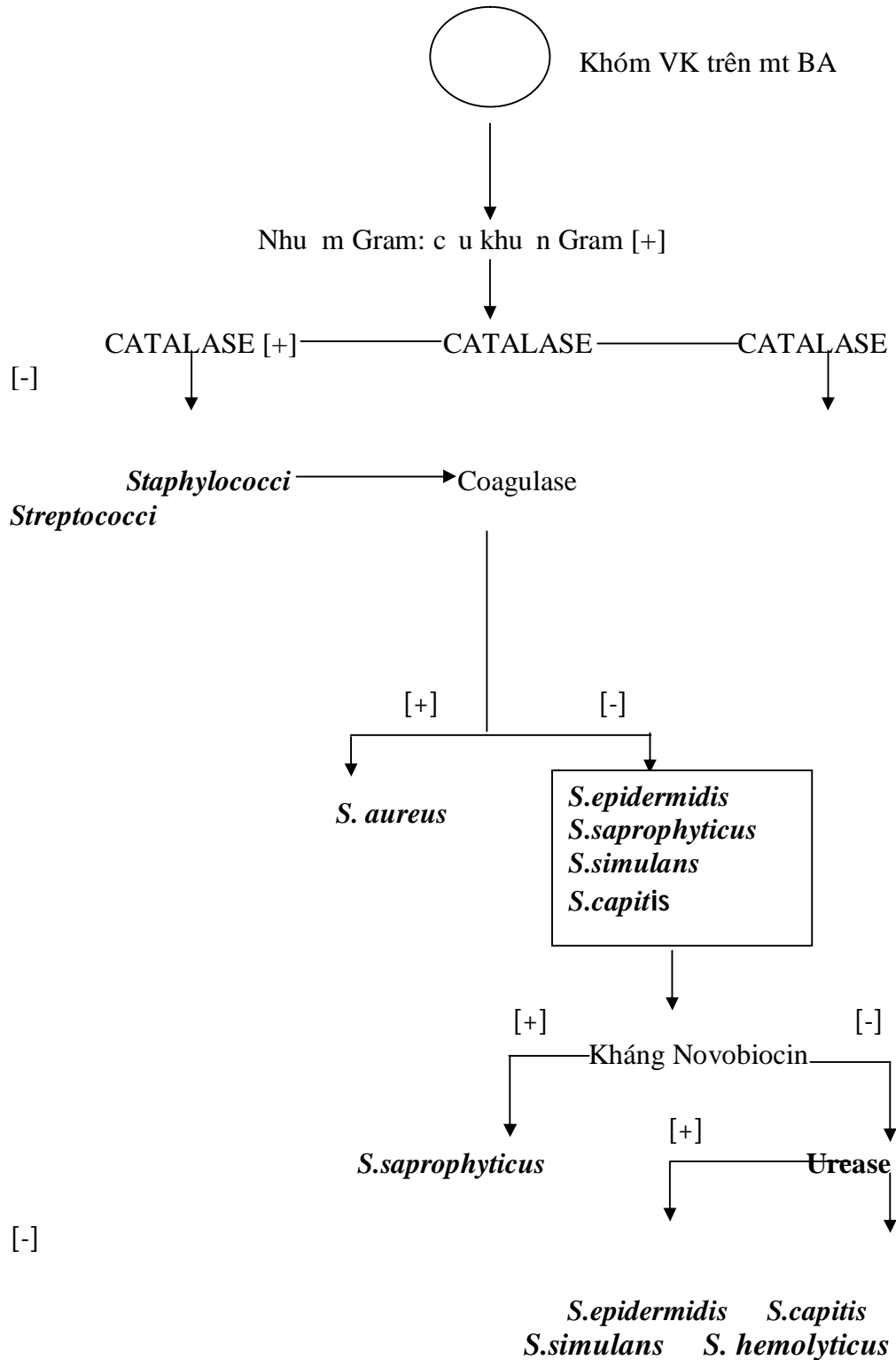
4.6 Th nghi m Urea.

- M c ích: dùng nh danh *S. epidermidis* và *S. simulans*
- Nguyên t c: 2 vi khu n *S. epidermidis* và *S. simulans* có kh n ng s n xu t enzyme urease th y phân urea trong môi tr ng thành CO₂ và NH₃, làm môi tr ng b ki m hóa và chuy n sang màu h ng .
- K thu t: theo giáo trình VSCS
- K t qu : môi tr ng chuy n sang màu h ng à d ng tính à *S. epidermidis* và *S. simulans*. Môi tr ng không i màu à âm tính à *Staphylococci coagulase* âm khác.



Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ñ ng Nh t Linh

5. QUY TRÌNH NH DANH.



Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

II. CHU IC U KHU N STREPTOCOCCI.

1. N IC TRÚ VÀ TÍNH GÂY B NH.

Ø Chu ic u khu n có kh p m i n i trong thiên nhiên, là m t thành ph n trong h n t p vi sinh ng hô h p, ng tiêu hóa c a ng i và ng v t.

Ø Tùy lo i và tùy v trí nhi m khu n, chu ic u khu n s là tác nhân gây b nh ho c ch là vi khu n s ng ho i sinh.

Ø Chu ic u khu n có th gây các ch ng nhi m khu n tr c ti p nh :

- Viêm c h ng, viêm amygdale, thanh qu n, y t h u, viêm xoang, viêm tai gi a và có th gây viêm màng não.
- Viêm màng trong tim bán c p tính, nhi m khu n h u s n, h u gi i ph u, nhi m khu n huy t và nhi m trùng ng tí u.
- Nhi m khu n da: nh t, m n n c có m .

Ø Chu ic u khu n có th gây b nh gián ti p nh viêm hay siêu c m ng cho các mô trong ch ng phong th p c p tính, viêm màng trong tim và viêm c u th n.

Ø Vi c phân lo i chu ic u khu n r t ph c t p. Trong ch n oán phòng thí nghi m ng i ta th ng k t h p 2 y u t : *kì u tiêu huy t và c u trúc kháng nguyên xác nh 1 ch ng gây b nh.*

2. C TÍNH HÌNH TH VÀ NHU M.

Hình c u, ng kính kho ng 0.8- 1µm, s p x p thành hình chu i, u n khúc dài ng n khác nhau. Không di ng, không bào t .

3. C TÍNH NUÔI C Y.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Ø *Streptococci* t ng tr ng kém, không m c trên môi tr ng thông th ng, ch m c c trong các môi tr ng có y ch t dinh d ng nh : BHI ho c các môi tr ng có huy t thanh hay h ng c u. Vi khu n t ng tr ng m nh trong i u ki n có CO₂, glutamine, riboflavin,...Hi u khí hay k khí tùy nghi.

Ø Nhi t thích h p cho a s các lo i *Streptococci* là 37⁰C. Tuy nhiên các vi khu n thu c nhóm D (*Enterococci*) có th m c 15 – 45⁰C.

Ø Sau 24h nuôi c y trên môi tr ng thích h p, khóm vi khu n có hình tròn, ng kính kho ng 1mm hay nh h n, trong, tr ng xám, h i nhám và l i.

4. C TÍNH SINH HÓA VÀ NH DANH.

4.1 Kh o sát hi n vi.

Nhu m Gram tr c ti p t b nh ph m hay t l a c y

L u ý: Trong kh o sát kính hi n vi tr c ti p d ch não t y, n u k t qu tìm th y có c u khu n Gram d ng x p thành chu i, nên báo cáo ngay k t qu lâm sàng vì nó có giá tr c bi t trong tr ng h p viêm màng não c n i u tr ngay t c kh c.

4.2 Th nghi m Catalase.

Dùng phân bi t các nhóm vi khu n nghi ng là t c u khu n v i chu i c u khu n (xem ph n I)

4.3 Ph n ng tiêu huy t.

- M c ích: Quan sát và ghi nh n ph n ng tiêu huy t quang các khóm khu n trên th ch máu. T ó nh h ng và l a ch n các th nghi m c n th c hi n ti p theo.

- Nguyên t c và k thu t: xem giáo trình VSCS.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- K t qu : Tùy lo i chu i c u khu n s cho 1 trong 3 ki u tiêu huy t sau:

+ Tiêu huy t (tiêu huy t không hoàn toàn): h ng c u b ly gi i không hoàn toàn, t o nên vùng tiêu huy t nh , m , h i màu xanh.

+ Tiêu huy t (tiêu huy t hoàn toàn) : h ng c u b ly gi i hoàn toàn, t o nên vòng tiêu huy t r ng, sáng và trong bao quang khóm vi khu n trên th ch máu.

+ Tiêu huy t (không tiêu huy t) : h ng c u không b ly gi i nên không t o ra vòng tiêu huy t.



4.4 Th nghi m Taxo P (th nghi m nh y c m Optochin)

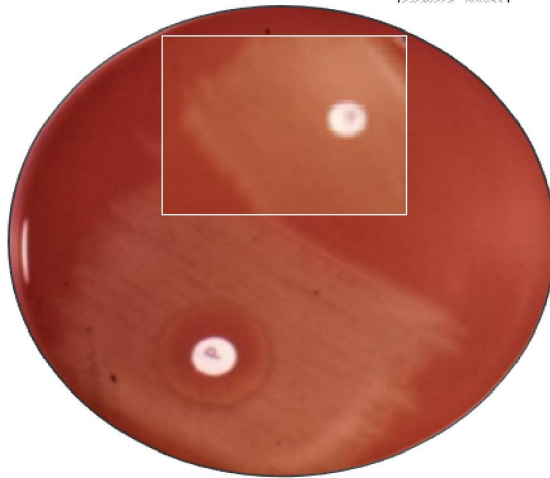
- M c ích: phân bi t *Pneumococcus* v i các *Streptococci* tiêu huy t khác (*S. viridans*).

- Nguyên t c: *Pneumococcus* nh y c m v i Optochin.

- K thu t: Dùng vòng c y hay t m bông vô trùng , l y 1 qu t vi khu n nghi ng là *Pneumococci* m c không quá 24h trên m t th ch máu c u BA, c y zic-zac v i ng c y dày và sét nhau trên m t th ch. Dùng k p vô khu n l y 1 a Optochin (Taxo P) t lên gi a vùng c y. h p BA th nghi m trong bình n n 35⁰C/24h.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- K t qu : vi khu n nh y c m v i Optochin có ng kính vòng vô khu n > 13mm quang a Optochin à và có th nh danh *Streptococci* tiêu huy t này là *S. pneumonia*.



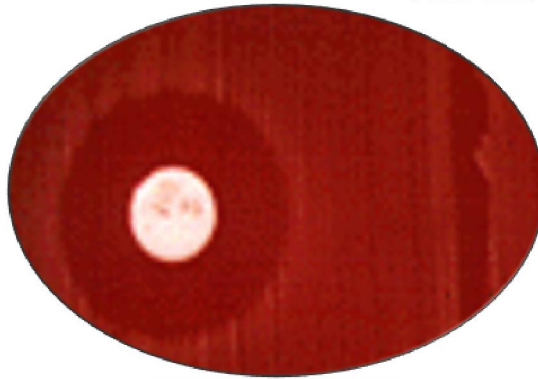
4.5 Th nghi m nh y c m Bactrim.

- M c ích: có th xác nh *Streptococci* th nghi m này **không ph i nhóm A hay B**

- K thu t: Dùng vòng c y hay t m bông vô trùng , l y l qu t vi khu n nghi ng là *Pneumococci* m c không quá 24h trên m t th ch máu c u BA, c y zic-zac v i ng c y dày và sét nhau trên m t th ch. Dùng k p vô khu n l y l a Bactrim t lên gi a vùng c y. h p BA th nghi m trong bình n n 35⁰C/24h.

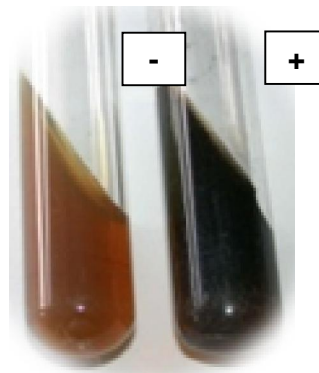
- K t qu : Vi khu n nh y c m v i Bactrim có vòng vô khu n > 15mm quanh a Bactrim à và có th xác nh *Streptococci* th nghi m này **không ph i nhóm A hay B**.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh



4.6 Th nghi m Bile esculin.

- M c ích: xác nh *Streptococci* th nghi m này là *Streptococci* **nhóm D**.
- Nguyên t c: *Streptococci* nhóm D có kh n ng th y phân Esculin (đ i i u ki n môi tr ng ch a 4% mu i m t) cho ra Glucose và Esculetin. Esculetin s ph n ng v i mu i Fe cho ra màu nâu m hay en trên b m t môi tr ng.
- K thu t: Dùng vòng c y l y l qu t vi khu n m c không quá 24h trên môi tr ng BA, c y zic-zac lên m t nghiêng th ch hay tube th ch Bile esculin. ình n n 35⁰C/24h.
- K t qu : xu t hi n màu nâu m hay en trên b m t môi tr ng à Bile esculin đ ng tính à k t lu n vi khu n *Streptococci* **nhóm D**.



4.7 Th nghi m dung n p NaCl 6.5%.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- M c ích: phân bi t ***Enterococci*** và ***Non enterococci*** trong ***Streptococci nhóm D***

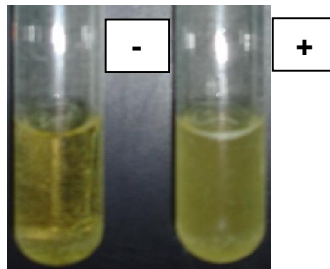
- Nguyên t c: *Enterococci* có th dung n p NaCl 6.5% hay có th m c c trên môi tr ng này.

- K thu t: Dùng vòng c y l y l qu t vi khu n m c không quá 24h c y vào môi tr ng TSB b sung 6.5% NaCl. 35⁰C/24h.

- K t qu : dung n p NaCl 6.5% khi vi khu n m c c trong môi tr ng.

+ Vi khu n ***Streptococci nhóm D*** (bile esculin d ng) n u dung n p c NaCl 6.5% thì nh danh là ***S. faecalis***

+ Không dung n p thì nh danh là ***S. faecium***.



4.7 Th ng hi m Taxo A (th ng hi m nh y c m v i Bacitracin).

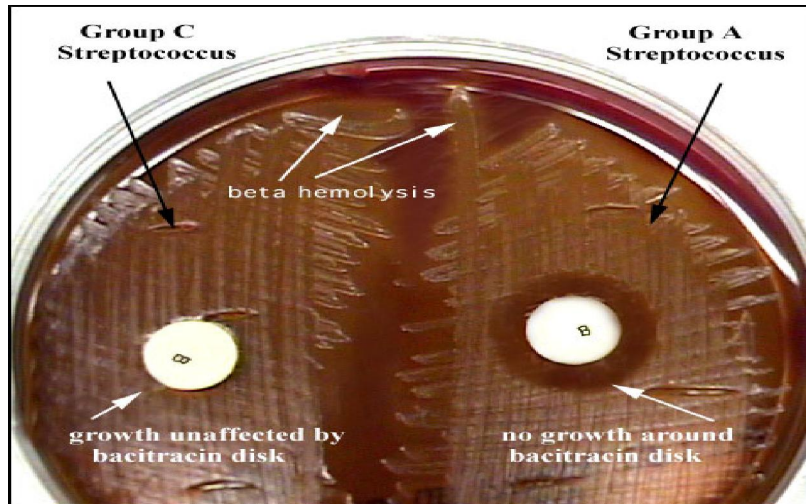
- M c ích: nh danh *Streptococci* tiêu huy t này là ***Streptococci tiêu huy t nhóm A***

- Nguyên t c: *Streptococci* tiêu huy t nhóm A có kh n ng nh y c m v i Bacitracin

- K thu t: Dùng vòng c y hay t m bông vô trùng , l y l qu t vi khu n *Streptococci* tiêu huy t m c không quá 24h trên m t th ch máu c u BA, c y zic-zac v i ng c y dày và sít nhau trên m t th ch. Dùng k p vô khu n l y l a Bacitracin (Taxo A) t lên gi a vùng c y. h p BA th ng hi m trong bình n n 35⁰C/24h.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- K t qu : Vi khu n nh y v i Bacitracin khi có vòng vô khu n quanh a Bacitracin mà không c n o ng kính vòng vô khu n này à nh danh là *Streptococci* tiêu huy t nhóm A.



4.8 Th nghi m CAMP (Christie, Atkins, and Munch-Peterson).

- M c ích: dùng nh danh *Streptococci* tiêu huy t là nhóm B (*S. agalactiae*).

- Nguyên t c: y u t CAMP là m t ch t ngo i bào c s n xu t b i *Streptococci* nhóm B có tác d ng h p ng tiêu huy t v i - lysin c a *S. aureus*.

- K thu t:

+ Trên h p th ch máu c u BA, dùng que c y l y 1 qu t vi khu n *S. aureus* có men tiêu huy t - lysin c y l v ch vào gi a m t th ch.

+ Sau ó dùng vòng c y l y 1 qu t vi khu n *Streptococci* tiêu huy t th nghi m, c y l ng th ng góc v i v ch c y *S. aureus* và ng ng cách v ch c y *S. aureus* kho ng 2-3mm.

+ 35⁰C/ 24h, không bình n n.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- K t qu : CAMP test đ ng : khi t i u v ch c y ti p c n v i v ch *S. aureus* có 1 vùng tiêu huy t hình m i tên h ng v ch c y *S. aureus* à ***Streptococci* nhóm B (*S. agalactiae*)**.



TÓM L I : Trong nh danh chu i c u khu n c n xác nh rõ:

Ø K i u tiêu huy t , , trên BA

Ø nh nhóm:

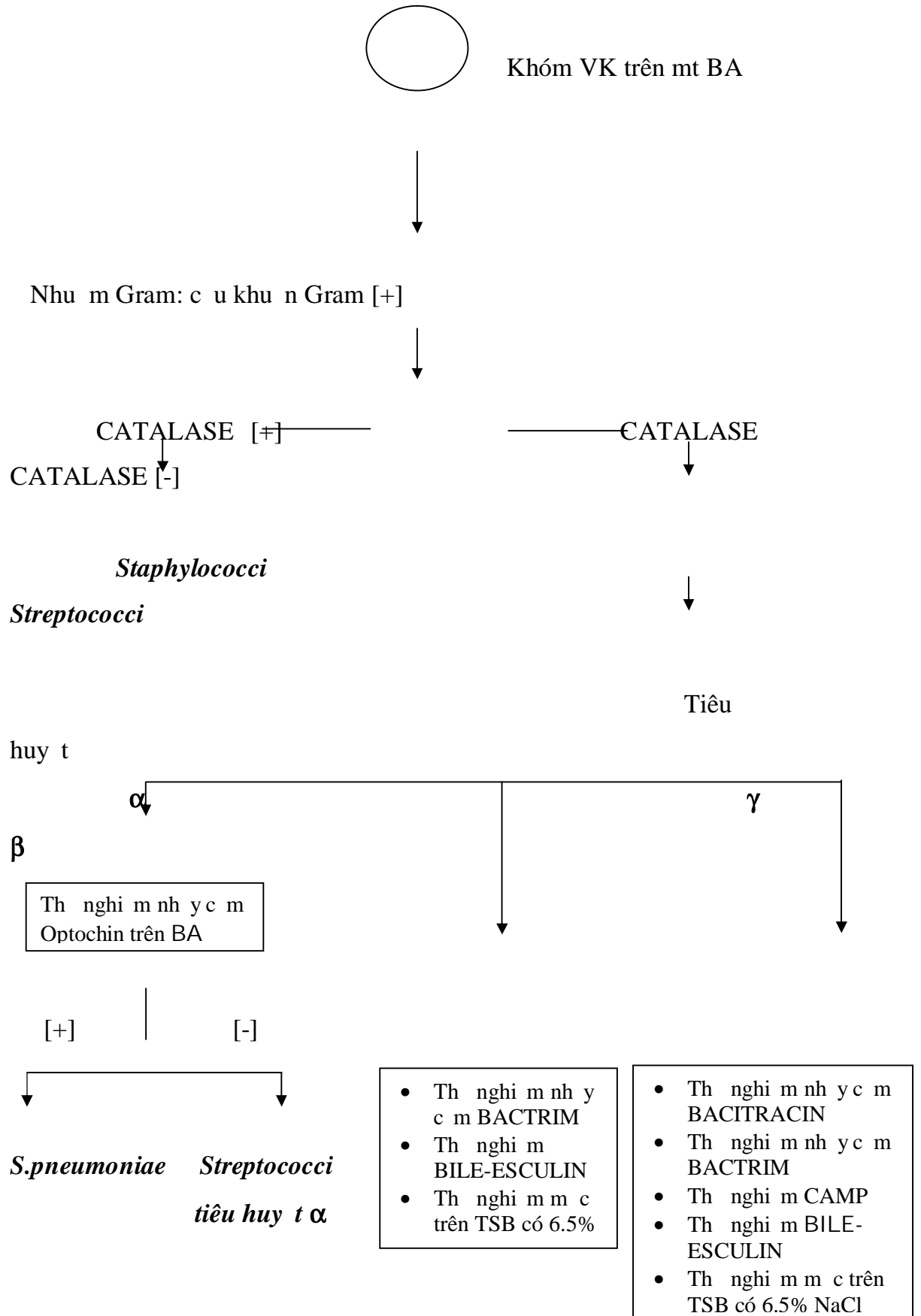
- Nhóm A: b ng a Taxo A cho riêng vi khu n nghi ng chu i c u tiêu huy t .
- Nhóm B: b ng th nghi m CAMP cho khóm vi khu n nghi ng chu i c u cho tiêu huy t .
- Nhóm D: b ng th nghi m Bile esculin, kh n ng dung n p NaCl 6.5% cho t t c 3 k i u tiêu huy t .

Ø Ghi k t qu nh danh cu i cùng bao g m 2 ph n:

- K i u tiêu huy t , , và nh nhóm A, D ho c không thu c A, D
- Ví d : *hemolytic Streptococci group A β* à chu i c u tiêu huy t nhóm A.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ñ ng Nh t Linh

5. QUY TRÌNH NH DANH.



Thi c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

	Nh y c m Bacitracin	Nh y c m Bactrim	Bile esculin	CAMP	TSB + 6,5% NaCl	Tiêu huy t β	Tiêu huy t α hay γ
Streptococci nhóm A	+	-	-	-	-	+	-
Streptococci nhóm B	-	-	-	+	-	+	-
<i>Streptococcus faecalis</i> (nhóm D)	-	-	+	-	+	+/-	+/-
<i>Streptococcus faecium</i> (nhóm D)	-	+	+	-	-	+/-	+/-
Streptococci nhóm khác	-	+	-	-	-	+/-	+/-

BÀI 2: K THU T NH DANH PH Y KHU N T

I. PH Y KHU N T *VIBRIO CHOLERAE*

1. N I C TRÚ VÀ TÍNH GÂY B NH.

- Ø Dòng *Vibrio* g m có lo i ho i sinh, h p sinh gây b nh cho ng i và thú. Lo i gây b nh d ch t cho ng i là *Vibrio cholerae* thu c nhóm O₁ (*Vibrio cholerae* type c i n và *Vibrio cholerae* type eltor)
- Ø Ph y khu n t xâm nh p c th b ng ng tiêu hóa, t ng tr ng mau l t i niêm m c ru t, không xâm nh p vào ng máu, các vi khu n b tiêu bào phóng thích n i c t , phá ho i th ng bì ru t gây ra tri u ch ng th t , a n tình tr ng c th m t n c nhanh và m t th ng b ng các ch t i n gi i. B nh nhân ch t n u không ph c h i l i l ng n c ã m t.
- Ø Ph y khu n t có th tìm th y trong phân b nh nhân, trong ch t nôn m a và th c ph m b nhi m khu n. Phân c a ng i b nhi m khu n t r t c bu\i t, phân nh n c c nh n c vo g o, ch a nh ngh t l n c n nh h t g o.

2. C TÍNH HÌNH TH VÀ NHU M.

- Ø Là nh ng tr c khu n cong hay còn c g i là ph y khu n, ng n, m nh, kích th c kho ng 0.5 x 3µm, Gram âm. Tính ch t ph y bi n m t sau nhi u l n c y truy n.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Ø Di d ng nhanh, không sinh nha bào.

3. C TÍNH NUÔI C Y.

Ø Ph y khu n t m c d dàng trong môi tr ng nuôi c y bình th ng, không òi h i y u t t ng tr ng c bi t, nh ng c n 5 -15mmol/l NaCl kích thích vi khu n m c t t h n.

Ø a môi tr ng ki m pH 7.8 -9. S ng c nhi t 16-42⁰C, nhi t t i u 37⁰C. Thu c lo i hi u khí .

Ø *Vibrio cholerae* ch t nhanh trong môi tr ng acid, d b di t b i các ch t t y u , c bi t nh y c m v i s khô, ch t n t i 10min 55⁰C. Tuy nhiên có th s ng c 4 – 7 ngày trên rau trái t i mát và m.

Ø Trong môi tr ng peptone pH= 8: ph y khu n t t ng tr ng nhanh sau 6-8h/37⁰C, làm c u và có váng n i trên m t môi tr ng.

Ø Trên môi tr ng MacConkey (MC): khóm vi khu n tròn, biên u, ph ng hay l i, màu h ng nh t do không lên men ng Lactose.

Ø Trên môi tr ng TCBS: khóm vi khu n tròn, biên u, l i tròn, màu vàng do lên men ng Succrose.

4. C TÍNH SINH HÓA VÀ NH DANH

4.1 C y phân l p

Ø C y tr c ti p

- L y tr c ti p t b nh ph m c y lên b m t môi tr ng MC ho c TCBS

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- L y tr c ti p t b nh ph m c y vào môi tr ng peptone

Ø Sau khi môi tr ng peptone mang i , vi khu n m c, l y t v áng trên môi tr ng peptone c y l i trên môi tr ng MC ho c TCBS

4.2 Kh o sát hi n vi

Ø Nhu m Gram: kh o sát tính ch t hình ph y và cách n màu

Ø Soi t i: kh o sát tính di ng c a vi khu n t

4.3 Th nghi m Oxidase: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.4 Th nghi m KIA: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.5 Th nghi m IMVIC: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.6 Th nghi m Urea: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.7 Th nghi m lên men các lo i ng Mannitol, Succrose,

Arabinose: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.8 Th nghi m Motility: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.9 Th nghi m PAD (Phenyl Alanine Deaminase).

Ø Nguyên t c: m t s vi khu n có kh n ng s m xu t men deaminase kh amin c a amino acid phenylalanine thành m t Keto acid, ch t này k t h p v i ion Fe trong thu c th Ferric chloride 10% t o ph c h p màu xanh lá cây

Ø K thu t: c y vi khu n c n nh danh lên m t nghiêng c a môi tr ng, 37⁰C/18-24h. Nh 4-5 gi t Ferric chloride 10% lên m t nghiêng c a th ch, nghiêng tube qua l i nhi u l n. Quan sát s i màu

Ø K t qu : xu t hi n màu xanh lá cây ph n nghiêng môi tr ng à d ng tính

Không i màu thu c th à âm tính à *V. cholorea*.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

TÍNH CH T SINH HÓA C A PH Y KHU N T

Th nghi m		c tính sinh hóa
Oxidase		+
KIA	Lactose	-
	Glucose	+
	H ₂ S	-
	CO ₂	-
Motility		+
Urea		-
Indol		+
Methyl Red		-
VP		+(V.cholerae type eltor)
		- (V. cholerae type c i n)
Citrate		+
PAD		-
Sucrose		+
Mannitol		+
Arabinose		-

4.10 Th nghi m huy t thanh ng ng k t

Ø K thu t:

§ Ch n các nhóm vi khu n nghi ng trên môi tr ng TCBS hoặc MC, làm huy n d ch v i n c mu i sinh lý trong ng nghi m s ch

§ L y lame kính chia thành 3 ô b ng bút chì m . Nh vào m i ô 1 gi t huy n d ch vi khu n

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

§ Nh l n l t m i ô 1 gi t huy t thanh Ogawa, Inaba và n c mu i sinh lý.

§ Dùng m i ô 1 que c y riêng bi t, tr n 2 gi t cho u nhau, quan sát s ng ng t d i ánh sát thích h p.

Ø K t qu .

Ogawa	Inaba	N c mu i	K t lu n
+	-	-	Ph y khu n t g c Ogawa
-	+	-	Ph y khu n t g c Inaba
+	+	-	Ph y khu n t g c Hikojima
-	-	-	Không ph i ph y khu n t

4.11 Th nghi m ng ng k t h ng c u gà.

Ø M c ích: phân bi t *V. cholerae* gi a 2 type c i n và eltor.

Ø K thu t: Dùng bút chì m k 2 ô trên lame kính s ch. Nh 1 gi t h ng c u gà 3% vào m i ô. Sau ó, nh 1 gi t vi khu n và 1 gi t n c mu i sinh lý l n l t vào m i ô. Dùng m i ô 1 que c y riêng bi t, tr n u 2 gi t. Quan sát s ng ng k t.

Ø K t qu : Ng ng k t h ng c u gà: ***V. cholerae* type eltor.**

Không ng ng k t h ng c u à ***V. cholerae* type c i n.**

BÀI 3: K THU T NH DANH TR C KHU N M XANH

1. N I C TRÚ VÀ TÍNH GÂY B NH.

Ø Gi ng *Pseudomonas* th ng s ng trong thiên nhiên: trong t, trong n c, không khí, nh t là n i m th p, k c trong môi tr ng b nh vi n, môi tr ng m t là quan tr ng nh t i v i vi khu n này.

Ø ng i, vi khu n có th s ng nh ng vùng da m nh rách, háng và l s ít trong ru t. Còn g i là tr c khu n m xanh.

Ø Tr c khu n m xanh (*Pseudomonas aeruginosa*) gây b nh: nhi m khu n tai, m t, v t th ng, v t ph ng, ng ti u và ng hô h p. Chúng gây nhi m khu n huy t và viêm màng não

Ø *Pseudomonas aeruginosa* là tác nhân gây nhi m khu n b nh vi n. Vi khu n này có th c tìm th y trong các túi máu, huy t t ng nhi m khu n c a ngân h àng máu, và trong c các dung d ch sát trùng nh Zepheran, Benzal konium chlorise hay các lo i xà phòng có Hexachlorophene

2. C TÍNH HÌNH TH VÀ NHU M.

Tr c khu n Gram âm, th ng hay h i cong, hình th thay i trong l a c y già, di ng, không bào t . Kích th c 0.6 x 2µm, ng m t mình hay thành ôi hay thành chu i ng n

3. C TÍNH NUÔI C Y.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Hi u khí tuy t i, m c d trên h u h t các môi tr ng thông d ng. M c t t nhi t 37 -42⁰C và có th m c nhi t 5-42⁰C

Tr c khu n m xanh t o c s c t Pyocyanin hòa tan trong môi tr ng làm môi tr ng có màu xanh l c hay nâu. L a c y t a mùi th m nh .

Trên môi tr ng BA: tiêu huy t , khóm vi khu n l n, ph ng hay h i l i, biên không u

Trên MC: không lên men ng Lactose, khóm vi khu n không màu

Trong canh c y l ng: vi khu n hi u khí m c thành váng n i trên m t.

4. C TÍNH SINH HÓA VÀ NH DANH.

4.1 Kh o sát hi n vi tr c ti p.

Nhu m Gram ã tr c khu n Gram âm.

4.2 Kh o sát c tính l a c y.

C n l u ý n kh n ng sinh s c t , tiêu huy t và có mùi th m nh n c tr ng.

L y nh ng khu l c nghi ng trên môi tr ng MC c y ria trên môi tr ng th ch Pseudomonas phát hi n fluorescin và môi tr ng th ch Pseudomonas phát hi n pyocyanin. 37⁰C/ 3 ngày. Ki m tra d i ánh sang c a tia t ngo i xác nh khu n l c c tr ng.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

**C I M HÌNH THÁI C A P.AERUGINOSA TRÊN CÁC
MÔI TR NG**

Môi tr ng	Th ch Pseudomonas phát hi n fluoresin	Th ch Pseudomonas phát hi n pyocyanin
c i m hình thái khu n l c	Không màu n màu vàng nh t	Màu xanh d ng
Hu nh quang ánh sáng c c tím	Xanh vàng	

4.3 Th nghi m Oxidase: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.4 Th nghi m KIA: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.5 Th nghi m Motility: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.6 Th nghi m Indol: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.7 Th nghi m Citrate: ã h c th c t p vi sinh c s .

4.8 Th nghi m LDC: (th nghi m Lysin decarboxylase)

- Nguyên t c: tìm s hi n di n enzyme decarboxylase th y phân các amino c hi u. u tiên vi khu n lên men ng Glucose, acid hóa môi tr ng, môi tr ng chuy n thành màu vàng. N u vi khu n có kh n ng s n xu t enzyme th y phân các amino acid và các alkaline amines c t o thành thì s làm ki m hóa tr l i và môi tr ng tr l i màu tím.
- Ti n hành: dung que c y th ng l y l qu t vi khu n nghi ng c y th ng vào môi tr ng LDC. 37⁰C/24h
- K t qu : Ph n ng d ng: vi khu n m c, môi tr ng gi màu tím
- Ph n ng âm : vi khu n m c, môi tr ng chuy n thành màu vàng hay vi khu n không m c

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

L U Ý: Khi c k t qu LDC, n u vi khu n ch m c trên b m t, không th y vi khu n m c xu ng d i sâu d c theo ng c y, thì ây là vi khu n hi u khí tuy t i. Nh v y ph i c k t qu là LDC (-) dù môi tr ng v n gi màu tím. Và ây c ng là tr ng h p c a *P. aeruginos*.

TÍNH CH T SINH HÓA C A TR C KHU N M XANH

Th nghi m	c tính sinh hóa
Oxidase	+
KIA	/ - không H ₂ S
Motility	+
Indol	-
Citrate	+
LDC	-

Bài 4: K THU T NH DANH VI KHU N TH NG HÀN *SALMONELLA TYPHI*

1. N I C TRÚ VÀ TÍNH G Y B NH.

- B nh th ng hàn do nhi m *Salmonella typhi* là b nh nhi m trùng toàn thân v i nh ng bi u hi n chính là s t và tri u ch ng b ng, ng i b m c ph i có nh ng d u hi u v th n kinh nh lú l n, kích ng, có gan lách to, y u c , s t cân, suy ki t. Và nh ng bi n ch ng c a th ng hàn gây th ng ru t v i s t, au b ng, xu t huy t tiêu hóa. Ngoài ra còn có m t s bi n ch ng hi m g p nh viêm n i tâm m c, nhi m trùng t i ch , áp xe gan lách, viêm tinh hoàn,....
- *S.typhi* là tác nhân gây ra b nh th ng hàn. Ngoài ra *S.paratyphi A*, *S.paratyphi B*, *S.paratyphi C* gây ra b nh phó th ng hàn có tri u ch ng gi ng th ng hàn nên ng i ta g i chung là th ng hàn.
- B nh th ng hàn do *S.typhi* gây ra, vi khu n xâm nh p vào c th theo ng tiêu hóa do th c n, n c u ng b nhi m b n. Sau khi vào ng tiêu hóa, vi khu n th ng hàn bám vào niêm m c ru t non r i xâm nh p qua niêm m c ru t vào các h ch m c treo ru t. ây vi khu n nhân lên r i qua h th ng b ch huy t và ng ng c i vào máu, lúc này các d u hi u lâm sàng b t u xu t hi n. T máu vi khu n n lách và các c quan khác. T i gan theo m t xu ng ru t r i c ào th i qua phân. T i th n m t s vi khu n c ào th i ra ngoài theo n c ti u. T i m ng payer, vi khu n ti p t c nhân lên.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

2. C TÍNH HÌNH TH VÀ NHU M.

S.typhi là m t loài thu c nhóm vi khu n ng ru t *Enterobacteriaceae*, d ng tr c , Gram âm, có kích th c 2-3 μ m x 0.4 -0.6 μ m, không t o giáp mô, không t o bào t , có kh n ng di ng nh lông mao quanh t bào.

3. C TÍNH NUÔI C Y.

S.typhi là lo i hi u khí tu nghi. Nhi t thích h p: 37°C, pH thích h p : 7,2 – 7,6. D m c trên các môi tr ng dinh d ng t i thi u:

- Trên NA: *S.typhi* t o khóm tr ng t, h i l i, t o 2 d ng khóm S (Smooth) và R (Rough).
- Trên canh l ng NB: t o c u lâu l ng c n
- Trên MC (Mac Conkey): khu n l c *S.typhi* nh n l áng, màu tr ng.
- Trên BA (Blood Agar): *S.typhi* không gây dung huy t, có khu n l c màu tr ng, tr n l áng.
- Trên th ch Deoxycholate: *S.typhi* t o khu n l c đ t, màu có th có tâm en.
- Trên SS (Salmonella Shigella Agar): khu n l c c a *S.typhi* có màu tr ng có th có tâm en.
- Trên HE (Hektoen enteric) : khu n l c *S.typhi* màu xanh (cùng màu v i môi tr ng) có th có tâm en.
- Trên BSA (Bismuth Sunfit Agar): *S.typhi* t o khu n l c en ho c xanh en.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

4. C TÍNH SINH HÓA VÀ NH DANH.

4.1 Ch n oán tr c ti p.

4.1.1 Nhu m soi tr c ti p t b nh ph m.

Nhu m soi tr c ti p t phân ít có giá tr ch n oán. Th ng ti n hành nhu m m b ch c u a nhân nh h ng ch n oán. Trong b nh th ng hàn, m t b ch c u a nhân trong phân kho ng 20 trên m t vi tr ng (phóng i X400)

4.1.2 C y máu.

- C y máu c ti n hành khi b nh nhân ang s t cao, c n l y máu tr c khi i u tr kháng sinh. Theo tiêu chu n thì môi tr ng c y máu ph i là môi tr ng th ch máu có b sung TSB ho c BHI broth. Tuy nhiên có th dùng môi tr ng th ch máu, ho c MC phân l p. Môi tr ng MC c s d ng nhi u b i kh n ng ch n l c c a nó. Trong MC có mu i m t, có kh n ng c ch các vi khu n gram d ng và các vi khu n gram âm không ch u c mu i m t, vì v y gi m c kh n ng t p nhi m. Sau khi c y xong em m 37°C / 18-24 gi .
- Khi th y có vi khu n m c, ti n hành nhu m gram, xem hình th và tính ch t b t màu. C y chuy n sang môi tr ng c, quan sát tính ch t khu n l c.
- Th c hi n l a c y tinh khi t: quan sát khóm vi khu n trên môi tr ng th ch sau khi ã 18- 24h. Ch n l khóm vi khu n m c riêng l c y vào môi tr ng BHI l ng. 37°C / 2-4h.
- Ki m tra tính ch t sinh hóa: dùng l a c y tinh khi t ã , c y vào môi tr ng sinh hóa.
- Cu i cùng xác nh công th c kháng nguyên b ng kháng huy t thanh m u: Nh trên phi n kính m t gi t n c mu i sinh lý,

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

tr n vi khu n vào i ch ng (B). Bên i ch ng là m t h n
d ch tr ng c u.

Nh vào ô th 2, m t gi t kháng huy t thanh nh ng ng k t,
tr n vi khu n (A).

- + Ph n ng ng ng k t d ng (+): sau 5 phút, có ng ng k t
thành nh ng h t nh , l n c n.
- + Ph n ng ng ng k t âm (-): h n d ch v n c u.
- N u ch a i u tr kháng sinh, tu n l u t l c y máu d ng
tính t i 90%, tu n th hai kho ng 70-80%, tu n th ba kho ng
40-60%. C y máu d ng tính cho phép ta xác nh ch c ch n
b nh nhân m c b nh th ng hàn.

4.1.3 C y phân:

Trong phân có nhi u lo i vi khu n vì v y b nh ph m c n ph i
c c y vào môi tr ng c ch ch n l c. Môi tr ng ch n l c
c y phân th ng c s d ng là nh ng môi tr ng sau:

- Mac Conkey agar (MC).
- Desoxycholate citrat agar
- Xylose-Lysine-Desoxycholate agar (XLD)
- Hektoen enteric agar (HE)
- Salmonella Shigella (SS)
- Bismuth sulfite agar (BSA)

Sau khi c y em m 37°C/ 24 gi . Sau th i gian
m, có th phát hi n ra s hi n di n c a vi khu n th ng hàn
b ng cách nh n di n các khu n l c i n hình trên môi tr ng
chuyên bi t

Ch n khu n l c i n hình ti n hành nhu m soi, và ti n
hành làm các ph n ng sinh hoá .

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

M t trong nh ng ph n ng sinh hoá tiêu bi u c a *S.typhi* là ph n ng KIA cho k t qu / vàng có sinh H₂S.

S.typhi có kh n ng lên men ng glucose không sinh h i (ây là c i m phân bi t v i các loài *Salmonella* khác).

C TÍNH SINH HÓA C A *SALMONELLA TYPHI*.

Th nghi m	c i m sinh h a
Nitrate	+
LDC	+
Mannitol	+
Oxidase	-
Urea	-
Indol	-
Bile esculin	-
MR	+
VP	-
Citrate	-
Malonate	-
Motility	+

Ch riêng c y phân, dù phân l p c vi khu n c ng không cho phép ta xác nh ch c ch n b nh nhân m c b nh th ng hàn vì ng i lành c ng có th mang vi khu n th ng hàn.

C y phân ngoài m c ích ch n oán b nh còn có giá tr ki m tra sau khi b nh nhân ã h t các d u hi u lâm sàng có còn tì p t c ào th i vi khu n n a hay không. C y phân còn là ph ng pháp phát hi n ng i lành mang vi khu n.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

B ng so sánh các c tính sinh hoá c a vi khu n gây th ng
hàn v i các vi khu n gram âm gây b nh khác.

Vi khu n	KIA				MIU			Citrate
	Glu	Lac	H ₂ S	Khí	Motil i-ty	Indol	Urê	
<i>S.typhi</i>	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>S.paratyphi A</i>	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Samonnella spp.</i>	+	-	+/-	+/-	+	-	-	+/-
<i>E.coli</i>	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Klebsialla spp.</i>	+	+	-	+	-	+/-	+	+
<i>Citrobacter spp.</i>	+	+/-	+	+	+	+/-	-	+
<i>Proteus spp.</i>	+	-	+	+	+	+/-	+	+/-

4.2 Ch n oán gián ti p.

Ti n hành ph n ng Widal xác nh kháng th trong
huy t thanh.

Sau khi nhi m 8 ngày , trong máu b nh nhân xu t hi n kháng th
O và sau 10-12 ngày xu t hi n kháng th H . Th i gian t n t i
kháng th trong máu trung bình là 3 tháng i v i kháng th O và
1-2 n m i v i kháng th H .

L y 5ml máu, ông , l y huy t thanh, pha loãng ra
nhi u n ng khác nhau và sau ó cho vào m t l ng kháng
nguyên nh t nh (kháng nguyên O, H, Vi). t m 37°C / 2
gi , l y ra nhi t phòng thí nghi m, sau 24 gi c k t
qu . Trong giai o n u có th ch th y kháng th O. n giai

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

o n toàn phát s th y c kháng th O và H , tuy nhiên kháng th H cao h n kháng th O.

Vi c phân tích k t qu xét nghi m l n th nh t nhi u khi r t khó và th ng không cho phép ta k t lu n ch c ch n. Ph n ng c n c làm 2 l n xác nh ng l c kháng th : l n u làm tu n th nh t, l n hai làm tu n th hai c a b nh. N u ng l c kháng th cao m i cho phép có ch n oán ch c ch n. Nh c i m c a ph ng pháp ch n oán này là cho k t qu ch m.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

PH N 3: K THU T PHÂN TÍCH B NH PH M

BÀI 1: PH NG PHÁP L Y VÀ G I B NH PH M

Trong công tác phân tích b nh ph m ch n oán m t b nh nghi ng nhi m khu n thì k thu t c y, g i b nh ph m và k thu t nh danh u là nh ng giai o n quan tr ng, do ó các sai sót x y ra b t c giai o n nào u c ng em l i k t qu sai l c.

1.CÁCH L Y B NH PH M.

V trí l y b nh ph m.

V trí l y b nh ph m trên b nh nhân c chia thành 2 nhóm:

- *Ch không có h n t p vi sinh:* g m các l u ch t (máu, d ch não t y, d ch kh p, d ch màng ph i, màng tim, màng b ng...), các m ng sinh thi t mô sâu. C n ph i ki m soát ch t ch s ngo i nhi m khi l y và phân tích b nh ph m
- *Ch có h n t p vi sinh:* g m các ch t bài ti t (àm, phân, n c ti u, niêm m c các l thiên nhiên, da,...) ph i dùng k thu t ch n l c phân l p vi khu n gây b nh ra kh i h n t p ho i sinh.

Th i gian l y b nh ph m.

- Tu thu c vào quá trình b nh lý c a b nh.
- Th i gian l y b nh ph m r t quan tr ng và th ng do y bác s quy t nh, vì k t qu c y khu n ch có th h u nghi m úng vào th i gian nào ó c a b nh, trong m t vài tr ng h p k t qu vô nghi m t m u th duy nh t không h n ã ch n oán c b nh nhi m khu n mà ôi khi ph i l y m u th nhi u l n trong vòng 24- 48h. Ph i l y b nh ph m tr c khi dùng thu c kháng sinh hay Sulfamid. Tr ng h p không th c, ph i ghi rõ cách tr li u: *n u b nh nhân ã dùng*

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

Penicillin c n thêm Penicillinase vào môi tr ng nuôi c y hay ã dùng Sulfamides thì cho thêm vào môi tr ng nuôi c y ch t para aminobenzoic acid.

Quy lu t l y b nh ph m.

Khi l y b nh ph m c n tuy t i tuân th các quy lu t sau:

- Các d ng c l y b nh ph m (kim, ng tiêm, que bông) ph i tuy t i vô khu n.
- Các d ng c ch a ng b nh ph m ph i có n p y kín và ph i vô khu n ngo i tr l ng phân (nh ng ph i s ch).
- Không cho b nh ph m ch m vào b t c hóa ch t di t khu n nào.
- T t c b nh ph m ph i c ghi nhãn và phi u th nghi m rõ rang.
- Ph i g i b nh ph m ngay n phòng thí nghi m và phân tích b nh ph m ngay sau khi nh n.
- Ph i c y b nh ph m tr c khi làm tiêu b n hay các th nghi m khác.
- Khi c n m t bào trong b nh ph m l ng ph i tr n u b nh ph m và rút ra th tích c n thi t trong i u ki n tuy t i vô trùng tr c khi quay ly tâm b nh ph m, sau ó dùng c n l ng c y và ph n n c n i làm các xét nghi m sinh hoá.

Các ph ng tí n l y b nh ph m.

Các ph ng tí n này tu thu c vào lo i b nh ph m:

Ø *D ng c l y b nh ph m.*

- ng tiêm và kim: l y các b nh ph m c n âm xuyên qua da.
- Dao l y máu: cào các v t au trên da.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- ng mao qu n và khuyên c y khu n: l y ch t ngo i ti t l ng bên ngoài.
- Que bông: dùng l y b nh ph m các l t nhiên, nh t v .
Ø D ng c ng b nh ph m.
- Chai có n p v n: ng àm, n c d dày, m nh mô, phân.
- ng nghi m có n p v n: ng b nh ph m l ng.
- H p petri.
- Chai l n: ng n c ti u tìm tr c khu n lao.

2. CÁCH G IB NH PH M.

2.1 Ngo i tr máu, ph i cho vào chai hay ng môi tr ng c y máu sau khi l y.

2.2 Các b nh ph m khác nên cho vào chai môi tr ng chuyên ch Cary Blair v i que bông t m b nh ph m.

2.3 N u c n ch i xa nên hàn n p chai môi tr ng chuyên ch b ng parafin và cho vào l h p có 2 l p, chèn bông c n th n cho kh i v (phi u th nghi m chèn vào 2 l p c a h p).

2.4 Ph i g i b nh ph m ngay n phòng thí nghi m trong vòng 24h.

BÀI 2: PHÂN TÍCH B NH PH M- CÁC M U M VÀ CH T D CH

1. Ch nh.

- T t c các tr ng h p có m , ch t d ch nh :
- M áp xe.
- V t th ng nhi m trùng, bao g m các v t loét, c t, l , m h u ph u, loét do n m lâu.
- Các m ch l n.
- Các m ch d n t xoang hay h ch b ch huy t.
- Các d ch ti t nh d ch màng ph i, kh p, màng b ng.
- Các m u n o m x ng khi gi i ph u.

1. Các lo i b nh ph m và cách l y.

M áp xe, d ch màng ph i, màng b ng, kh p: l y b ng ph ng pháp vô trùng nh khi làm ti u ph u, sau khi sát trùng vùng da bên ngoài và ch khô, ch c kim hút l y m hay ch t d ch. Cho m hay ch t d ch vào l l y b nh ph m vô trùng (n p v n ch t) hay tube Eppendorf biopure (tinh s ch sinh h c), hay nguyên ng kim hút m , r i g i ngay n phòng thí nghi m yêu c u c y ngay. Có th t m m vào t m bông r i cho vào môi tr ng chuyên ch Stuart-Amies (dùng c p tube a t m bông vô trùng/tube a Stuart-Amies), hay có th c y ngay t i gi ng b nh v i chai 2 m t th ch c y các d ch không t p nhi m (xem gi i thi u chai 2 m t th ch c y DNT và các d ch không t p nhi m) r i chuy n v phòng thí nghi m.

Các v t th ng nhi m trùng: lau s ch vùng da lành chung quanh v i c n 70%. Lau s ch m trên v t th ng b ng g c vô trùng th m n c mu i sinh lý vô trùng. Dùng t m bông vô trùng l y m u qu t l y m , ch t d p nát, hay mô (ngay d i l p m ã chùi

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

s ch); hay l y m u cho vào l l y b nh ph m vô trùng, hay tube Eppendorf biopure r i g i ngay n phòng thí nghi m yêu c u c y ngay. N u ch a có th g i ngay, cho t m bông ã qu t m vào môi tr ng chuyên ch Stuart-Amies (dùng c p tube a t m bông vô trùng/tube a Stuart-Amies).

Các n o m hay mô khi gi i ph u: c ng c l y b ng qu t t m bông hay tr c ti p cho m u vào l l y b nh ph m vô trùng, hay tube Eppendorf biopure r i g i ngay n phòng thí nghi m. N u ch a có th g i ngay, cho vào môi tr ng chuyên ch Stuart-Amies (dùng c p tube a t m bông vô trùng/tube a Stuart-Amies).

Các m ch l n hay m ch d n: dùng t m bông mảnh vô trùng lu n vào m ch l n; hay pipette Pasteur nh a hút l y m cho vào l l y b nh ph m vô trùng, hay tube Eppendorf biopure r i g i ngay n phòng thí nghi m. N u ch a có th g i ngay, cho vào môi tr ng chuyên ch Stuart-Amies (dùng c p tube a t m bông vô trùng/tube a Stuart-Amies).

2. Kh o sát i th .

- Màu: , vàng, xanh...
- Mùi: th i, tanh, h ng...
- Tính ch t: c, l ng, nh y, có máu...

3. Kh o sát vi th .

- Nh m Gram. N u k t qu nhu m Gram th y có vi khu n thu n khi t, có th làm kháng sinh tr c ti p m u b nh ph m.
- Nhu m kháng acid (n u có yêu c u).

4. Nuôi c y.

- C y ngay vào các h p th ch phân l p:
- T i thi u là BA hay BA có Nalidixic acid (BANg) và MC hay

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

EMB.

- N u có i u ki n, c y thêm MSA hay DNA agar, BA có Gentamicin.
- N u nghi n m, c y thêm th ch Sabouraud.
- Các h p BA ph i c 35-37°C trong t m CO₂ hay bình n n. Các tr ng h p khác, khí tr ng bình th ng.
- Quan sát h p th ch liên t c trong 3 ngày, m t khi có khúm vi khu n m c, ti n hành nh danh và làm kháng sinh ngay.
- C y d phòng vào m t ng Thioglycollate hay BHI, ng th i v i các h p th ch phân l p. N u trên h p th ch phân l p không có vi khu n m c mà ng BHI hay Thioglycollate c thì c y phân l p t các ng môi tr ng n y.

5. Các vi khu n gây b nh có th phân l p c.

Ø Th ng g p.

- *Streptococcus pyogenes*.
- *Staphylococcus aureus*.

Ø Ít g p h n.

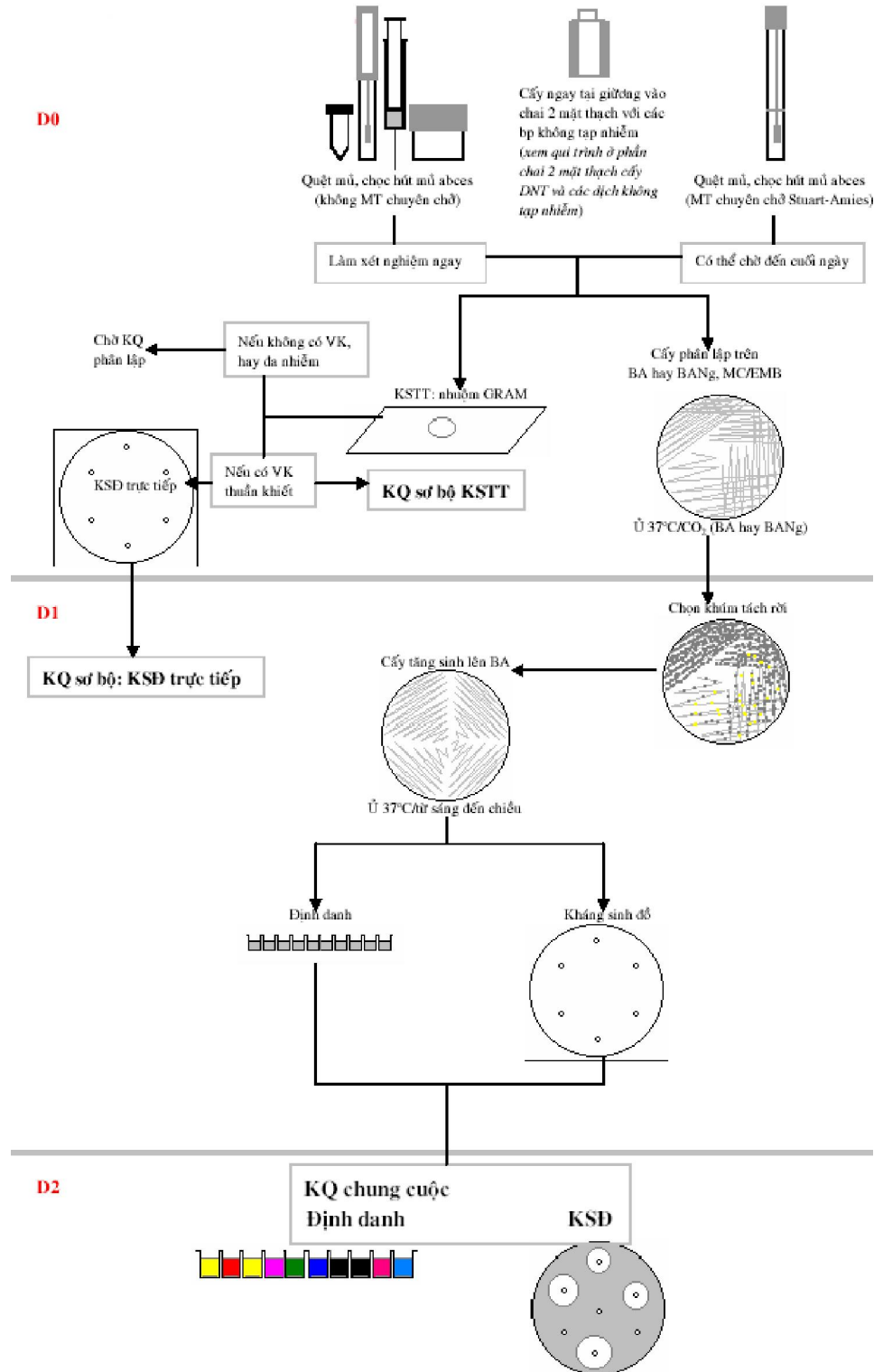
- Các tr c khu n Enterobacteriaceae.
- Pseudomonas và các tr c khu n Gram (-) không lên men.
- Streptococci (các loài khác),
- Clostridium perfringens,
- Bacteroides và các vi khu n k khí khác.

Ø R t hi m g p.

- *Bacillus anthracis*.
- *M. tuberculosis*.
- *M. ulcerans*.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

- *Pasteurella multocida*..



Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

PH N 4: PH N NG HUY T THANH H C

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

**BÀI 1: PH N NG NG NG K T KHÁNG NGUYÊN –
KHÁNG TH .**

I. (Agglutination).

Kháng nguyên th ng là vi khu n s ng (hay ch t). Khi g p kháng th t ng ng, các vi khu n này k t l i v i nhau thành ám, ó là hi n t ng ng ng k t. K t qu ph n ng có th quan sát b ng m t th ng.

1. C ch ph n ng:

Trong h n d ch kháng nguyên h u hình, vi khu n phân tán xa nhau do các l c, ch y u là l c t nh i n. Khi cho h n h p kháng nguyên ti p xúc v i kháng th , kháng th s g n vào kháng nguyên t o nên ám ng ng k t l n c n.

2. Th c hành và c k t qu :

Nh trên phi n kính (g ch men) m t gi t n c mu i sinh lý, tr n vi khu n vào i ch ng (B). Bên i ch ng là m t h n d ch tr ng c u.

Nh c nh bên, m t gi t kháng huy t thanh nh ng ng k t, tr n vi khu n (A).

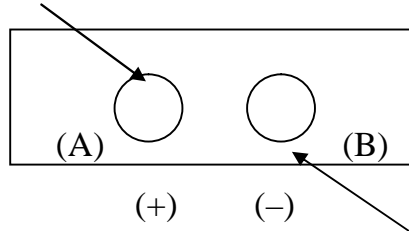
Ph n ng ng ng k t d ng (+): sau 5 phút, có ng ng k t thành nh ng h t nh , l n c n.

Ph n ng ng ng k t âm (-): h n d ch v n c u.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

1 gi t Kháng huy t thanh a giá O + 1 vòng vi khu n

Salmonella



1 gi t n c mu i sinh lý + vi khu n

Salmonella

Hình: K t qu ph n ng ng ng k t

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

**BÀI 2: PH N NG NG NG K TH NG C U HA
(Hemagglutination test) và PH N NG NG N TR
NG NG K TH NG C U HI (Hemagglutination
Inhibition test)**

**I/ PH N NG NG NG K TH NG C U HA
(Hemagglutination test).**

1. Nguyên lý:

M t s virus có kh n ng k t dính trên m t h ng c u, t o c u n i và làm k t t h ng c u, có th th y b ng m t th ng ho c qua kính lúp. ây là ph ng pháp quan tr ng ch ng minh kh n ng ng ng t h ng c u c a virus và các thành ph n c a chúng khi nuôi c y t bào trong phôi gà, giúp ta nh tính và nh l ng c virus.

2. Th c hành:

Ø Pha h ng c u gà 1%:

L y 10ml máu gà cho vào bình tam giác có 3,5 ml dung d ch Natri citrat 3,8% ch ng ông máu. Ly tâm 1.500 vòng/ phút cho h ng c u l ng xu ng, hút b huy t t ng, b ch c u và ti u c u i, cho NaCl 9‰ vô khu n vào r a h ng c u. Ti p t c ly tâm, hút b ph n n c trong trên (r a và ly tâm 3 l n). Gi l i ph n h ng c u, pha h ng c u 1% trong NaCl 9‰ vô khu n.

Ø Chu n b n c tr ng ch a virus:

L y não gà nghi ng m c b nh Newcastle nghi n thành huy n d ch 1/10 v i NaCl 9‰, kh t p khu n b ng kháng sinh

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

r i c y vào xoang ni u mô c a phôi gà ã p t 10 – 11 ngày, p
ti p 38°C – 39°C, sau 2 – 4 ngày phôi ch t (tùy c l c c a
m m b nh), l y phôi cho vào t l nh t 0°C – 4°C trong 4 gi
các m ch máu co l i, hút l y n c tr ng.

Ø Th ph n ng:

Dùng v nh a ho c 9 ng nghi m s ch.

L y pipette 1 hút vào ng th nh t 0,9 ml NaCl 9%, các ng t
2 – 8 m i ng 0,5 ml NaCl 9%.

Dùng pipette 2 hút vào ng th nh t 0,1 ml n c tr ng nuôi
virus, tr n u. Hút 0,5 ml t ng 1 sang ng 2, tr n u. L i hút
0,5 ml t ng 2 sang ng 3, c th cho n ng th 8. Hút 0,5 ml
trong ng th 8 b i.

V y hi u giá pha loãng n c tr ng t ng th 1 n 8: 1/10,
1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280.

Cho h ng c u gà 1% vào t t c các ng, m i ng 0,5 ml, l c u.
yên t 5 – 10 phút, c k t qu .

- Ph n ng âm tính: ng th 9 ch có 0,5 ml NaCl 9% và 0,5
ml h ng c u gà 1%. Do ó h ng c u gà b l ng xu ng áy
thành m t c c máu tròn , ph n d ch trên trong. ó là hi n
t ng h ng c u óng nút.

- Ph n ng d ng tính: h ng c u ng ng k t thành nh ng m ng
h ng tr i u ph n áy ng nghi m, có nh ng v tr n n t.
Hi u giá ng ng k t c ng có pha loãng l n nh t mà
v n có hi n t ng ng ng k t.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	v									i ch ng
NaCl 9%	ml	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
N c tr ng có KN	ml	0,1 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0
									B i 0,5 ml t ng 8	
[C] pha loãng KN		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	0
H ng c u gà 1%	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L c u, yên t 15 – 20 phút, c k t qu .										
Quan sát hi n t ng		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
K t qu		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Hi u giá kháng nguyên	n =					1/160				

II. PH N NG NG NTR NG NGK TH NG C U HI
(Hemagglutination Inhibition test)

1. Nguyên lý:

M t s virus có kh n ng ng ng k th ng c u, kháng huy t thanh (antiserum) t ng ng có kh n ng làm m t hi n t ng này. Ph n ng HI dùng phát hi n và chu n kháng th (nh tính và nh l ng) có trong kháng huy t thanh.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

2. Th c hành:

Ø L y huy t thanh gà b nh:

L y máu tim ho c ng m ch c c a gà b nh cho vào bình tam giác vô khu n, trong t l nh $4^{\circ}\text{C}/30 - 60$ phút. Nghiêng bình tam giác, dùng b m + kim tiêm hút d ch trong h i h ng trên, cho vào ng nghi m vô khu n.

Ø Pha kháng nguyên hi u giá $(n - 2)$:

Gi s hi u giá c c ph n ng HA là: $n = 1/160$
 $\Rightarrow (n - 2) = 1/40$. Dùng pipette 1ml, hút 0,1ml n c tr ng ch a virus (ng g c) ph n ng HA, cho vào ng nghi m nh , vô khu n. L y pipette 5ml, hút v a 3,9ml n c NaCl 9%, b sung vào ng nghi m. Ta c 4ml d ch kháng nguyên hi u giá $(n - 2) = 1/40$.

Ø Th ph n ng:

Dùng v nh a ho c 10 ng nghi m s ch.

L y pipette 1 hút vào 9 ng u, m i ng 0,25ml NaCl 9%, ng th 10: 0,5ml NaCl 9%.

Dùng pipette 2 hút vào ng th nh t 0,25ml huy t thanh gà b nh, tr n u. Hút 0,25ml t ng 1 sang ng 2, tr n u. L i hút 0,25ml t ng 2 sang ng 3, c th cho n ng th 8. Hút 0,25ml trong ng th 8 b i.

V y hi u giá pha loãng huy t thanh t ng th 1 n 8: $1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256$.

Dùng pipette 3 hút kháng nguyên ã chu n $(n - 2) = 1/40$ cho vào ng th 1 n 9, m i ng 0,25ml. L c u, yên t 5 - 10 phút, KN k th p v i KT (n u t ng ng).

Cho h ng c u gà 1% vào t t c các ng, m i ng 0,5 ml, l c u. yên t 5 - 10 phút.

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

3. c k t qu :

ng th 9: i ch ng (-), trong ó có KN và h ng c u, KN k t h p v i HC t o hi n t ng ng ng k t.

ng th 10: i ch ng (+), trong ó ch có h ng c u, h ng c u óng nút (t c b ng n tr ng ng k t).

- Ph n ng d ng tính: nh ng ng nghi m có hi n t ng óng nút h ng c u. Hi u giá kháng th là pha loãng huy t thanh cao nh t mà v n có kh n ng ng n tr ng ng k t HC.
- Ph n ng âm tính: nh ng ng nghi m có hi n t ng ng ng k t.

	n v	1	2	3	4	5	6	7	8	9 i ch ng âm	10 i ch ng d ng
NaCl 9%	ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5
Huy t thanh gà b nh	ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0	0
										B i 0,25 ml t ng 8	
[C] pha loãng HT		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	0	0
KN ã	ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

chu n (n- 2)											
Tr n u, yên t 5 – 10 phút, KN k t h p KT (n u có)											
H ng c u gà 1%	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tr n u, yên t 15 – 20 phút, KN còn th a (sau ph n ng k t h p KN – KT), s ng ng k t HC											
Quan sát hi n t ng		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
K t qu		(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Hi u giá kháng th				1/8							

Th c t p vi sinh gây b nh - Tr ng i h c M Tp. HCM
D ng Nh t Linh

TÀI LI U THAM KH O

1. B môn xét nghi m (2002), *Vi sinh y h c.* H Y D c TPHCM.
2. B môn vi sinh (2001), *Th c t p vi sinh mi n d ch.* H Y D c TPHCM.
3. B môn vi sinh (2002), *Vi khu n h c.* H Y D c TPHCM.
4. B môn vi sinh (2001), *Th c t p vi sinh mi n d ch.* H Y D c TPHCM
5. Nguy n H u Chí (2001), *Các b nh nhi m trùng ng tiêu hóa th ng g p.* NXB Y h c.
6. Phan H u Ngh a, Tô Minh Châu (2000), *Th c hành Vi sinh mi n d ch.* Tr ng H M Bán Công Tp. HCM..
7. Lê ình Ti m và c ng s (1972), *K thu t xét nghi m.* NXB Y h c.
8. Ph m Hùng Vân (2002), *Các k thu t xét nghi m vi sinh lâm sang.* H Y D c TPHCM.
9. <http://www.austin.cc.tx.us/microbugz>.