Chương 35. Bacillus

Nội dung

Chương 35. Bacillus 1
35.1. Giới thiệu 3
35.2. Bacillus 3
35.3. Cấu trúc bề mặt của *Bacillus* 4
35.3.1. Lớp S 5
35.3.2. Capsule 5
35.3.3. Thành tế bào 6
35.3.4. Tiên mao 7
35.3.5. Nội bào tử 7
35.4. *Bacillus anthracis* 8
35.4.1. Đặc điểm của vi khuẩn 9
35.4.2. Thành phần thành tế bào và thuộc tính kháng nguyên 14
35.4.3. Đặc điểm gây bệnh 14
35.4.4. Miễn dịch của cơ thể chủ 19
35.4.5. Dịch tể học 20
35.4.6. Môi trường sống 20
35.4.7. Nguồn và sự lan truyền bệnh 20
35.4.8. Vi khuẩn than và chiến tranh sinh học 20
35.4.9. Phương pháp phát hiện 21
35.4.10. Điều trị 24
35.4.11. Phòng ngừa và kiểm soát 24
35.5. Trực khuẩn gây nhọt 25
35.5.1. Giới thiệu 25
35.5.2. Bacillus *cereus* 26

35.5.3. Chuẩn bị mẫu 30
35.5.4. Nuôi cấy *B. cereus* 30
35.5.5. Đếm *B. cereus* bằng phương pháp MPN 31
35.5.6. Khẳng định *B. cereus* 31
35.5.7. Đặc điểm định danh: 33

35.1. Giới thiệu

Họ *Bacillaceae* gồm những vi khuẩn hình que còn gọi là trực khuẩn, Gram dương, hình thành bào tử. Họ này gồm hai giống vi khuẩn chính hình thành nội bào tử, đó là: (1). *Clostridium* là giống vi khuẩn kỵ khí hình thành bào tử và (2). Giống *Bacillus* gồm những vi khuẩn kỵ khí tùy nghi hình thành bào tử. Trong chương này chỉ nói về giống *Bacillus,* còn giống còn lại đã đề cập tại Chương 41. *Clostridium*.

35.2. Bacillus

Bacillus là giống vi khuẩn thuộc nhóm hóa dị dưỡng, có khả năng hô hấp nhờ sử dụng nhiều hợp chất hữu cơ đơn giản như đường, amino acid, acid hữu cơ. Một số thành viên thuộc giống *Bacillus* cũng có khả năng lên men đường để tạo ra các sản phẩm điển hình là glycerol và butanediol. Một số loài như *Bacillus megaterium* không đòi hỏi chất hữu cơ cho tăng trưởng, ngược lại một số loài khác đòi hỏi amino acid hoặc vitamin B hoặc cả hai để tăng trưởng. Vi khuẩn thuộc giống này chủ yếu là nhóm ưa nhiệt vừa, nhiệt độ tối thích trong khoảng 30 và 45^0C, nhưng một số khác có khả năng ưa nhiệt, nhiệt độ tối thích lên đến 65^0C. Một số khác nữa lại thuộc nhóm ưa lạnh, có thể tăng trưởng và hình thành bào tử ở 0^0C. *Bacillus* tăng trưởng trong khoảng pH rất rộng từ 2 - 11. Trong phòng thí nghiệm, dưới những điều kiện tăng trưởng lý tưởng, thời gian nhân đôi thế hệ của các loài *Bacillus* là khoảng 25 phút.

Hầu hết các loài *Bacillus* là vi khuẩn hiếu khí hình thành bào tử, dễ dàng phân lập được và chúng cũng dễ dàng tăng trưởng trong điều kiện thí nghiệm. Kỹ thuật đơn giản nhất là tăng sinh bào tử từ mẫu đất pha loãng đã thanh trùng ở 80^0C/15 phút, sau đó cấy vào các đĩa môi trường dinh dưỡng và ủ ở 37^0C/24 giờ trong vài ngày. Sau đó kiểm tra các đĩa này trong vòng 24 giờ nhằm tìm kiếm các khuẩn lạc điển hình có các đặc điểm như: Gram dương, hình que có bào tử, có catalase dương. Nhiều loài có túi bào tử (sporangia) và không có bào tử trong vòng 24 giờ, nên một số chủng phân lập cần phải ủ trong thời gian 5 - 7 ngày trước khi túi bào tử trở nên thành thục và có thể quan sát được kích thước và hình dạng của nội bào tử trong túi bào tử. Các loài gây bệnh cho côn trùng *Paenibacillus larvae, P. popilliae* và *P. lentimorbus* thì khó phát hiện bào tử hơn và vì vậy cần phải phân lập trên môi trường thạch J. Hơn nữa chúng thường có catalase âm và

đòi hỏi môi trường đặc biệt hoặc nuôi cấy trong động vật chủ là côn trùng để hình thành bào tử.

Hầu hết các loài *Bacillus* có thể tăng trưởng trong môi trường xác định hoặc môi trường tương đối đơn giản. Một số ít vi khuẩn *Bacillus* ví dụ như *B. subtilis, B. megaterium*, chỉ cần nuôi cấy trên môi trường tối thiểu. Phân lập có thể được tiến hành trên môi trường dinh dưỡng (peptone 5g/l, cao thịt bò 3g/l, agar 15g/l, pH 6,8) hoặc trên môi trường thạch J (gồm tryptone 5g/l, cao nấm men 15g/l, K_2HPO_4 3g/l, glucose 2g/l, agar 20g/l, pH 7,4). Các chủng có thể bảo quản ở phòng thí nghiệm trong môi trường thạch có dịch chiết từ đất hoặc trong môi trường đặc biệt để tạo bào tử. Môi trường tối thiểu để *B. megaterium* tăng trưởng gồm: 10g sucrose; 2,5g K_2HPO_4; 2,5g KH_2PO_4; 1g $(NH_4)_2HPO_4$; 0,2g $MgSO_4$ $7H_2O$; 0,01g $FeSO_4$ $7H_2O$; 0,007g $MnSO_4$ $7H_2O$; bổ sung 985 ml nước; pH 7.

Giống *Bacillus* thường có nhiều trong đất, bụi và nước. Khuẩn này cũng được phát hiện như là những đối tượng ô nhiễm trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Giống *Bacillus* có hơn 50 loài. Trong đó *B anthracis* và *B cereus* là các loài quan trọng gây bệnh cho người và động vật. *B. anthracis* gây bệnh than còn *B. cereus* gây ngộ độc thực phẩm. Bệnh ở người do các loài *Bacillus* gây ra được tóm tắt ở Bảng 35.1.

Bảng 35.1. Bệnh ở người do các loài *Bacillus.*

Vi khuẩn	**Bệnh**
Bacillus anthracis	Bệnh than viêm màng não than
Bacillus cereus	Viêm dạ dày ruột, nhiễm trùng máu do đặt ống thông tĩnh mạch và viêm màng trong tim, gây ngộ độc thực phẩm
Bacillus licheniformis	Viêm dạ dày ruột
Các loài *Bacillus* khác	Bênh cơ hội

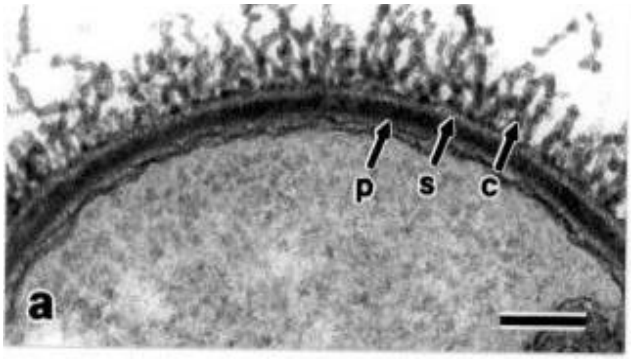
35.3. Cấu trúc bề mặt của *Bacillus*

Giống như hầu hết các vi khuẩn Gram dương, bề mặt của *Bacillus* là một phức hợp và có liên quan đến các đặc tính đặc trưng đó là: đặc tính dính, các phản ứng kháng và có tính chiến thuật. Bề mặt tế bào dinh dưỡng là một cấu trúc laminate nhiều lớp gồm có capsule, lớp bề mặt có protein còn gọi là lớp S, một số lớp peptidoglycan và các

protein trên bề mặt ngoài của màng plasma.

35.3.1. Lớp S

Các lớp bề mặt kết tinh là các tiểu đơn vị protein hay glycoprotein gọi là lớp S, được phát hiện trong *Bacillus*. Giống như các lớp S của các vi khuẩn khác, chức năng của các lớp này ở *Bacillus* hiện chưa được hiểu rõ, tuy nhiên chúng được cho là có liên quan đến khả năng bám dính của vi khuẩn. Đã có chứng minh cho thấy lớp S có thể là mặt nạ vật lý tích điện âm của lớp peptidoglycan trong một số vi khuẩn Gram dương và dùng để ngăn chặn sự tự kết đông. Cũng có đề nghị cho rằng lớp này có thể có một số vai trò nhất định trong tương tác giữa vi khuẩn và kim loại.



Hình 35.1. Bề mặt vi khuẩn *Bacillus*. Ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (TEM). C = Capsule; S = lớp S; P = Peptidoglycan, (Nguồn: Viện Pasteur).

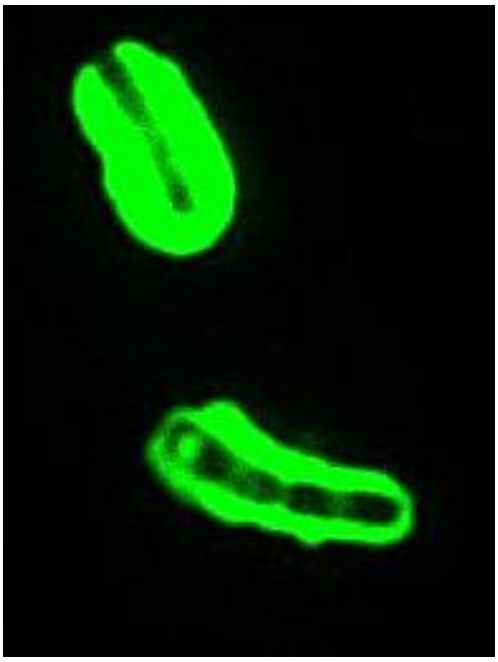
35.3.2. Capsule

Capsule của nhiều vi khuẩn như *B. anthracis, B. subtilis, B. megaterium* và *B. licheniformis* được cấu tạo từ poly-D- hay L-glutamic acid. Các loài *Bacillus* khác như *B. circulans, B. megaterium, B. mycoides* và *B. pumilus* tạo capsule dạng carbohydrate, phổ biến nhất là dextran và levan, tuy nhiên nhiều phức hợp polysaccharide cũng được sản sinh ra.

Một số polysaccharide của *Bacillus* phản ứng chéo với các kháng nguyên từ các giống vi khuẩn khác bao gồm cả vi khuẩn gây bệnh cho người. Ví dụ *B. mycoides* với *Streptococcus pneumoniae* type III; *B. pumilus* với *Neisseria meningitidis* nhóm A. Tương tự như vậy, capsule dạng polysaccharide của *Paenibacillus alvei* có tính kháng nguyên tương tự như *Haemophilus influenzae* type B (Hib).

Khi quan sát đưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (TEM), một số polypeptide và phức hợp capsule cấu tạo bằng polysaccharide có kiểu sắp xếp dạng sợi tơ trên bề mặt tế bào. Các capsule này cũng dễ dàng quan sát đưới kính hiển vi quang học, nhất là trong

điều kiện vi khuẩn được chuẩn bị trước và tăng trưởng trên môi trường có yếu tố kích thích để tạo capsule. Các chủng có vỏ bọc có thể hình thành các khuẩn lạc nhầy hoặc nhớt trên môi trường thạch.



Bacillus megaterium tổng hợp capsule có thành phần gồm cả polypeptide và polysaccharide. Polypeptide định vị dọc hai bên sườn theo trục tế bào, còn polysaccharide có ở các đỉnh và xung quanh đường xích đạo của tế bào.

Hình 35.2. Ảnh nhuộm kháng thể phát huỳnh quang (FA) capsule của *Bacillus anthracis* (CDC).

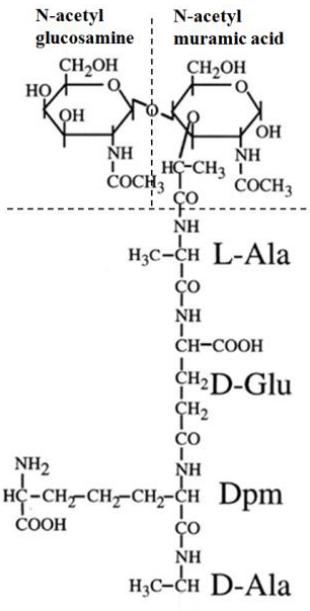
Capsule của *B. anthracis* là thành phần poly-D-glutamic acid. Capsule này là yếu tố quyết định độc tính chính trong phát sinh bệnh than. Các vi khuẩn có quan hệ gần nhất với *B. anthracis* ví dụ như *B. cereus* và *B. thuringiensis* thì không có khả năng tạo capsule và đây cũng là tiêu chí được sử dụng để phân biệt giữa các loài này.

35.3.3. Thành tế bào

Thành tế bào dinh dưỡng của tất cả các loài *Bacillus* được cấu tạo từ peptidoglycan có meso-diaminopimelic acid (DAP). Trong khi đó thành tế bào của *Sporosarcina pasteurii* và *Sporosarcina globisporus* chứa lysine ở vị trí của DAP. Kiểu cấu trúc này tương tự như dạng polymer của thành tế bào vi khuẩn Gram âm, ví dụ có DAP như diamino acid ở vị trí thứ 3 của tetrapeptide. Trong một số trường hợp, DAP liên kết chéo trực tiếp với D-alanine, tương tự như ở *Enterobacteriaceae*. Ở các trường hợp khác, hai chuỗi bên tetrapeptide của peptidoglycan dang rộng ra bằng cầu nối nội bào tử giữa DAP và D-alanine, điều này là điểm đặc trưng của hầu hết vi khuẩn Gram dương.

Hơn nữa peptidoglycan trong thành tế bào của tất cả các loài *Bacillus* chứa một lượng lớn teichoic acid liên kết với các chức muramic acid. Có sự dao động lớn của các kiểu glycerol teichoic acid giữa các loài *Bacillus* và trong phạm vi của một loài. Giống

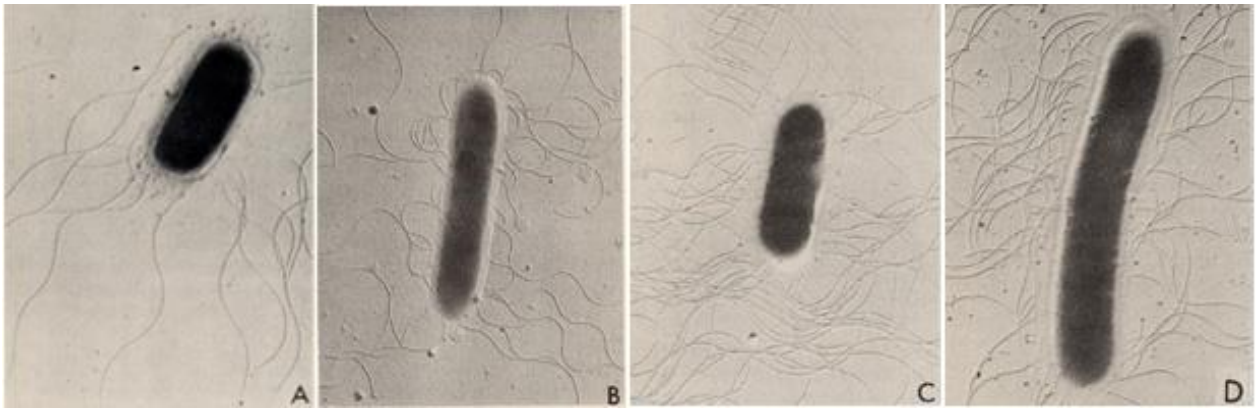
như ở nhiều vi khuẩn Gram dương khác, lipoteichoic acid được phát hiện có liên quan đến màng tế bào của các loài *Bacillus*. Các hợp chất này được cho là có liên quan đến tổng hợp teichoic acid của thành tế bào.



Hình 35.3. Cấu trúc tiểu đơn vị muropeptide của peptidoglycan thuộc *B. megaterium*. Trong hầu hết các loài *Bacillus*, không có cầu nối nội peptide để nối D-alanine với meso-diaminopimelic acid (DAP). Hơn nữa tất cả các bào tử *Bacillus* có tiểu đơn vị muramic acid dạng này trong phần vỏ của bào tử.

35.3.4. Tiên mao

Hầu hết vi khuẩn thuộc nhóm tạo bào tử hiếu khí di động nhờ tiên mao xung quanh tế bào. Tính hóa hướng động được nghiên cứu nhiều trên *B. subtilis*. *B. firmus* là những vi khuẩn ưa kiềm. Sợi tiên mao của chúng có hàm lượng amino acid kiềm thấp một cách đáng chú ý mặc dù đặc điểm này làm cho chúng có thể bền vững hơn trong môi trường có pH lớn hơn 11.

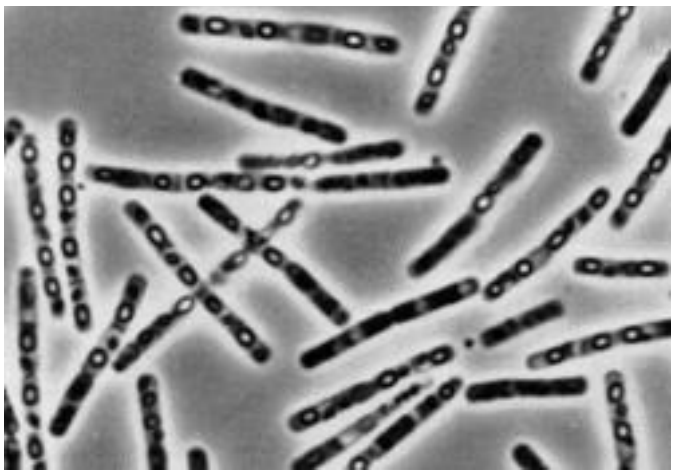


Hình 35.4. Tiên mao di động của *Bacillus* dưới kính hiển vị có độ phóng đại 15.000X, trong đó (A) là *B. subtilis*, (B) là *P. polymyxa*, (C) là *B. laterosporus* và (D) là *P. alvei* (Bộ Nông Nghiệp Hoa Kỳ).

35.3.5. Nội bào tử

Nội bào tử được Cohn mô tả đầu tiên ở *Bacillus subtilis* và sau đó Robert Koch mô tả ở vi khuẩn gây bệnh *B. anthracis*. Cohn đã chứng minh khả năng kháng nhiệt của

nội bào tử *B. subtilis* và Koch đã mô tả chu trình phát triển nội bào tử ở *B. anthracis*. Nội bào tử được đặt tên như vậy là bởi vì chúng được hình thành trong nội bào, mặc dù cuối cùng nội bào tử này cũng được phóng thích ra khỏi tế bào mẹ hay khỏi bào tử nang để thành bào tử. Nội bào tử đã được chứng minh là kiểu tế bào bền vững nhất được tìm thấy trong tự nhiên và ở trạng thái tiềm ẩn này, chúng vẫn có thể sống được trong một thời gian cực kỳ dài, có lẻ lên đến hàng triệu năm.



Hình 35.5. Đây là ảnh gốc của Robert Kock. Tế bào dinh dưỡng của *Bacillus thuringiensis* dưới kính hiển vi pha đảo (1000X), phần bên trong tế bào có màu sáng là nội bào tử và phần tối trên tế bào là tinh thể parasporal.

Khi xem ở trạng thái không nhuộm, nội bào tử của trực khuẩn đang sống có viền màu đen, rất sáng và khúc xạ. Nội bào tử kháng mạnh các chất nhuộm đơn giản. Tuy nhiên nội bào tử có khả năng kháng lại sự làm mất màu (acid fast). Nhờ đó một số chất nhuộm bào tử như Schaeffer-Fulton được sử dụng để phân biệt sự khác biệt giữa bào tử và tế bào dinh dưỡng.

35.4. *Bacillus anthracis*

Trực khuẩn gây bệnh than có tên khoa học là *Bacillus anthracis*, là vi khuẩn gây bệnh được mô tả đầu tiên. Năm 1877, Robert Koch (1843 - 1910) đã nuôi cấy thành công vi khuẩn này ở dạng chủng thuần. Khi đó ông đã chứng minh được khuẩn *Bacillus anthracis* này có khả năng hình thành nội bào tử và gây bệnh cho động vật khi tiêm vào cơ thể động vật.

B. anthracis là vi khuẩn phân bố rộng khắp. Chúng được tìm thấy trong đất. Bệnh than mắc phải qua đường hô hấp, da phơi nhiễm hay hấp thu qua dạ dày ruột (GI). Việc sử dụng bệnh than dùng làm vũ khí tấn công sinh học là mối quan tâm hiện nay.

Về mặt lịch sử, *B. anthracis* là vi khuẩn được quan tâm vì những lý do sau:

(1). Chúng là vi khuẩn gây bệnh đầu tiên được nhìn thấy dưới kính hiển vi.

(2). Là vi khuẩn đầu tiên được khám phá là nguyên nhân gây bệnh. Từ những nghiên cứu về bệnh than, năm 1876 Koch đã thiết lập ra định đề Koch nổi tiếng. Năm 1877, Robert Koch đã cho chủng vi khuẩn tinh khiết tăng trưởng, ông đã chứng minh được khả năng chúng hình thành nội bào tử và đã chứng minh bằng thực nghiệm, khuẩn này gây ra bệnh than bằng cách tiêm chúng vào động vật.

(3). Là vi khuẩn đầu tiên được phân lập thành chủng thuần có mang bào tử. Thời gian đầu, Koch và Cohn khám phá ra bào tử từ *B. anthracis* và *Bacillus subtilis* và họ đã thiết lập ra thuyết về mầm gây bệnh (germ theory).

(4). Là vi khuẩn đầu tiên được Louis Pasteur sử dụng để điều chế vaccine có độc tính được làm giảm.

35.4.1. Đặc điểm của vi khuẩn

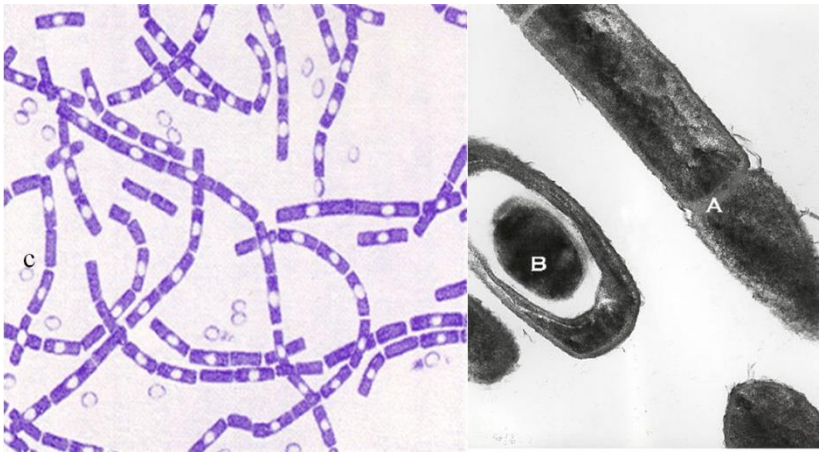
Hình thái: *Bacillus anthracis* là vi khuẩn Gram dương, tạo bào tử, có kích thước rất lớn, rộng 1 - 1,2 µm, dài 3 - 5 µm. Khuẩn này có thể nuôi cấy được trong môi trường dinh dưỡng thông thường ở điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Khi tiến hành thử nghiệm kính phết mô bị nhiễm, *B. anthracis* thường ở dạng tế bào đơn, cặp đôi và dạng chuỗi, chuỗi được capsule bao xung quanh. *B. anthracis* không di động và không bị acid fast. Khuẩn này có thể nuôi cấy được trong môi trường dinh dưỡng thông thường ở điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Kiểu gen và kiểu hình của chúng rất giống với *Bacillus cereus*. Trong nuôi cấy, *B. anthracis* phát triển thành chuỗi dài và có thể xuất hiện hình dạng tương tự như streptobacillus. Ở dạng chuỗi này, trực khuẩn sắp xếp theo kiểu đầu đối đầu và các đầu cuối của trực khuẩn trông giống như bị vát đi không còn dạng bầu tròn, hoặc thường bị lõm vào và có phần phồng lên đôi chút. Kiểu sắp xếp này trông giống như đốt tre (Hình 35.6).

B. anthracis có capsule. Khuẩn này hình thành capsule chỉ khi chúng tăng trưởng trên môi trường thạch dinh dưỡng có 0,7% sodium bicarbonate và ủ trong điều kiện có 5 - 20% CO_2. Capsule có cấu tạo từ polypeptide, một dạng polymer của D-glutamic acid. Capsule có chức năng bảo vệ vi khuẩn chống lại sự thực bào và phân giải của bạch cầu. Capsule thường được hình thành khi vi khuẩn có trong mô nhưng lại không có khi vi

khuẩn tăng trưởng trong nuôi cấy thông thường. Capsule dễ dàng nhận thấy được khi nhuộm bằng xanh methylene hay mực Tàu. Việc sản sinh ra capsule do plasmid pX02 có kích thước 60 megadalton kiểm soát. Vì vậy khi plasmid này được chuyển cho *B. anthracis* không có capsule bằng quá trình tải nạp sẽ xuất hiện chủng vi khuẩn hình thành capsule.

Hình 35.6. *B. anthracis* lấy từ phúc mạc (CDC), tế bào sắp xếp dạng đơn, cặp đôi và chuỗi trông giống như đốt tre.

Bào tử: khi nhuộm Gram *B. anthracis*, tế bào biểu hiện đặc điểm có đầu cuối vuông vứt, có bào tử không ăn chất nhuộm. Bào tử có dạng hình oval hay e lip, nằm ở vị trí giữa tế bào và khúc xạ. Độ rộng của bào tử có cùng kích cỡ với tế bào vi khuẩn nên chúng không làm tế bào dinh dưỡng phình lên. Bào tử vi khuẩn gây bệnh than gồm (*a*) thể nguyên sinh ở giữa, (*b*) lớp vỏ và (*c*) áo bào tử.



Hình 35.7. Nội bào tử của vi khuẩn *Bacillus anthracis* (C). Ảnh nhuộm crystal violet *B. anthracis* (1500X). Đầu cuối tế bào có dạng hình vuông. Nội bào tử hình có dạng hình e lip nhọn nằm ở giữ tế bào. Các bào tử khúc xạ ánh sáng và không ngấm chất nhuộm (K. Todar). (A). Tế bào đang phân đôi của *B. anthracis* dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (TEM) và (B) bào tử (CDC).

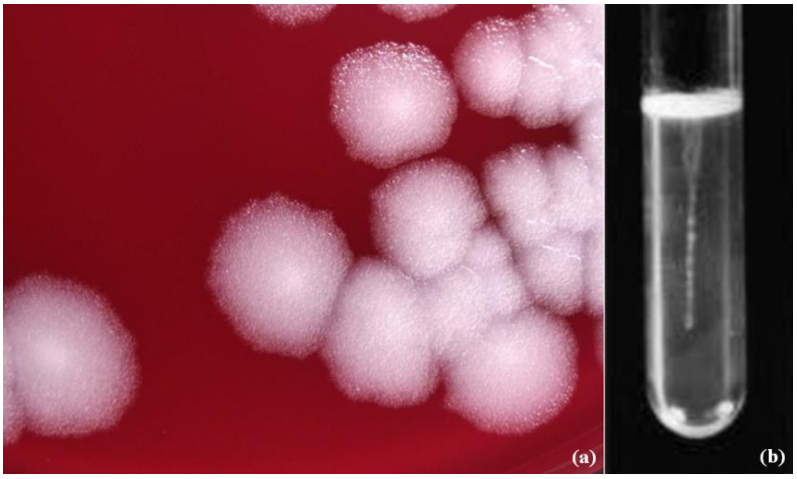
Thể nguyên sinh ở giữa bào tử hay còn gọi là tế bào mầm của bào tử mang các

thành phần của tế bào dinh dưỡng tương lai. Thể nguyên sinh này cũng có dipicolinic acid, là yếu tố giúp bào tử kháng được nhiệt.

Lớp vỏ (cortex), bao xung quanh thể nguyên sinh, gồm peptidoglycan (murein), có chức năng bảo vệ bào tử tránh khỏi tia xạ và nhiệt. Màng của lớp vỏ hay thành của thể nguyên sinh sẽ trở thành thành tế bào khi bào tử nảy mầm thành tế bào dinh dưỡng.

Áo phủ bào tử, được cấu tạo trên 50% khối lượng bào tử. Áo bào tử bảo vệ bào tử khỏi tác động của các chất hóa học, enzyme, ... Bào tử có tính khúc xạ cao và kháng được chất nhuộm, nhiệt, lạnh, chiếu xạ, làm khô và chất khử trùng. Bào tử được hình thành trong quá trình nuôi cấy hoặc trong đất ở những điều kiện thích hợp cho tăng trưởng. Bào tử vi khuẩn gây bệnh than cần oxygen để nẩy mầm. Bào tử của vi khuẩn than sẽ nẩy mầm khi được phơi trong điều kiện giàu dinh dưỡng như ở trong mô hay môi trường có máu động vật chủ. Trong môi trường đất, nước mưa sẽ kích thích sự nẩy mầm của bào tử, ruồi và động vật sẽ giúp phát tán chúng. Sự hình thành bào tử được tạo thuận lợi nhờ: *(a)* nitrogen và thành phần đất hữu cơ, *(b)* pH môi trường lớn hơn 6, *(c)* nhiệt độ môi trường lớn hơn 15°C, (*d*) có 2% sodium chloride và *(e)* sự hiện diện của nước cất. Sự hình thành bào tử bị ức chế do calcium chloride. Bào tử không bao giờ được tìm thấy trong mô tế bào chủ ngoại trừ dịch cơ thể bị nhiễm được phơi nhiễm ngoài không khí.

Nuôi cấy: *B. anthracis* là vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí tùy nghi. Khuẩn này tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ 12 - 45°C, nhiệt độ tối thích ở 37°C. Chúng có thể tăng trưởng trên nhiều môi trường trong đó có cả môi trường có dinh dưỡng bình thường và một số môi trường chọn lọc.



Hình 35.8. (a). Khuẩn lạc *Bacillus anthracis* trên môi trường thạch máu cừu sau 24 giờ ủ ở 37°C (CDC); (b). *Bacillus anthracis* trong môi trường bán rắn gelatin.

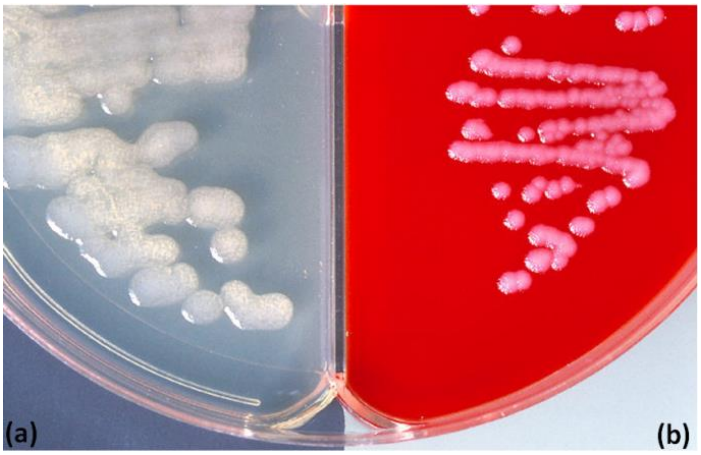
Nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng: trên môi trường thạch dinh dưỡng

sau 24 giờ ủ, *B. anthracis* tạo khuẩn lạc dạng hạt có màu xam xám, đường kính 2 - 3 mm. Dưới kính hiển vi có nguồn sáng thấp, gờ của khuẩn lạc dài ra, các chuỗi đan xen của trực khuẩn trông giống như các mớ tóc có hình dạng giống như đầu con sứa với bề mặt mấp mô và rìa gợn sóng.

Trên môi trường thạch máu: trên môi trường thạch có máu ngựa hay cừu, khuẩn lạc *B. anthracis* có màu xám hoặc trắng, thường không tiêu huyết, khô, có hình dạng trong giống như kính mờ. Đường kính của khuẩn lạc tối thiểu 3 mm và đôi khi có đuôi (Hình 35.8 a).

Trên môi trường rắn chọn lọc có penicillin: trên môi trường rắn chọn lọc có 0,05 - 0,5 U penicillin/mL, *B. anthracis* sẽ hình thành khuẩn lạc lớn, hình cầu trong vòng 3 - 6 giờ và xuất hiện chuỗi trên bề mặt thạch trông giống như chuỗi hạt ngọc trai. Đặc tính này được gọi là phản ứng chuỗi ngọc trai và dùng để phân biệt *B. anthracis* với *B. cereus* và các loài hiếu khí mang bào tử khác.

Trên môi trường gelatin: khi cấy đâm sâu vào môi trường gelatin, khuẩn này sẽ tăng trưởng theo đường cấy đâm cùng với đó là xuất hiện các đỉnh ngang kéo dài gần tới bề mặt thạch, tạo ra hình dạng trong giống cây linh sam hay cây thông úp ngược. Quá trình hoá lỏng gelatine thường diễn ra chậm, xảy ra sau 7 ngày ở 20°C và bắt đầu tại bề mặt (Hình 35.8b).



Hình 35.9. *Bacillus anthracis* trên môi trường thạch có bicarbonate và môi trường thạch máu. Thử nghiệm này dùng để kiểm tra *B. anthracis* hình thành capsule. (a). Khuẩn lạc nhầy do các chủng nhẵn (S) tạo ra trên môi trường thạch bicarbonate; (b). Khuẩn lạc do các chủng ráp (R) trên môi trường thạch máu (CDC).

Trên môi trường chọn lọc: môi trường thạch Knisely's Polymyxin B-lysozyme-EDTA thallous acetate (PLET) là môi trường chọn lọc được sử dụng để phân lập *B.*

anthracis từ hỗn hợp có chứa các trực khuẩn mang bào tử khác. Môi trường này được cấu tạo từ môi trường thạch có thành phần chiết xuất từ tim động vật, polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) và thallous acetate.

Việc sản sinh ra vật liệu capsule có liên quan đến sự hình thành dạng nhầy đặc trưng hay kiểu khuẩn lạc nhẵn (S). Trên môi trường có huyết thanh hoặc môi trường có bicarbonate, vi khuẩn có capsule sẽ hình thành khuẩn lạc nhẵn hoặc nhầy. Các biến thể nhẵn hình thành capsule là các chủng độc của *B. anthracis* (Hình 35. 9a). Các biến thể xù xì hay ráp (R), không có capsule nên là các chủng không gây bệnh (Hình 35. 9b).

Phản ứng sinh hóa: *B. anthracis* biểu hiện các phản ứng sinh hóa sau:

(a). Tạo acid từ glucose, maltose, sucrose, trehalose và dextrin,

(b). Không tạo acid từ lactose, arabinose, D-xylose hay D-mannitol.

(c). Khử nitrate thành nitrite.

(d). Có phản ứng lecithinase yếu trên môi trường thạch có egg-yolk, tạo vùng hẹp có màu trắng đục bao xung quanh khuẩn lạc.

(e). Khuẩn này có catalase dương.

Các đặc tính khác: nhạy cảm với các yếu tố vật lý và hóa học: tế bào dinh dưỡng của *Bacillus* nhạy cảm với nhiệt ẩm. Chúng sẽ bị tiêu diệt ở 60°C trong 30 phút. Bào tử *Bacillus* kháng được các điều kiện vật lý và hóa học, từ cát sa mạc và suối nước nóng đến các vùng đất lạnh ở Cực Bắc và từ các vùng nước ngọt đến trầm tích ở đại dương. Chúng vẫn có thể sống được ở các điều kiện môi trường có giá trị nhiệt độ, pH và nồng độ muối mà chỉ một số ít vi sinh vật khác có thể tồn tại được. Ở trạng thái khô và trong một số loại đất, dạng bào tử của vi khuẩn này có thể tồn tại trong thời gian 50 năm hoặc lâu hơn. Chúng tồn tại ở 5% phenol trong nhiều tuần. Bào tử của bacillus bị nhiệt ẩm tiêu diệt ở 100°C trong 60 phút. Chúng cũng bị tiêu diệt bằng formaldehyde 4% (trọng lượng/thể tích) hay bằng potassium permanganate 4% (trọng lượng/thể tích) trong một vài phút.

***Duckering*:** là kỹ thuật có thể được sử dụng để phá hủy bào tử của bacillus trong các sản phẩm động vật. Duckering là một quy trình được sử dụng để làm giảm số lượng bào tử vi khuẩn than trong len sợi mà không làm phá hủy lông động vật. Trong quy trình này sử dụng formaldehyde 2% ở nhiệt độ 30 - 40°C/ 20 phút để khử trùng len, hoặc sử

dụng dung dịch formaldehyde 0,25% ở 60°C trong 6 giờ.

35.4.2. Thành phần thành tế bào và thuộc tính kháng nguyên

Có ba thuộc tính kháng nguyên hiện diện trong trực khuẩn gây bệnh than gồm: (a). Kháng nguyên capsule, (b). Kháng nguyên thành tế bào và (c). Kháng nguyên thân.

Kháng nguyên capsule: kháng nguyên capsule hiện diện trong các chủng *B. anthracis* gây bệnh có capsule bao phủ. Kháng thể chống lại kháng nguyên capsule không thể bảo vệ được.

Kháng nguyên thành tế bào: kháng nguyên thành tế bào hiện diện trong thành tế bào và được cấu tạo từ *N*-acetylglucosamine và D-galactose. Nó phản ứng chéo với kháng nguyên nhóm máu A và capsule polysaccharide của *Pneumococcus* type 14. Kháng thể chống lại kháng nguyên thành tế bào thì không được bảo vệ.

Kháng nguyên thân: kháng nguyên thân là protein không bền nhiệt, hiện diện trong tế bào vi khuẩn. Nó kích thích hệ miễn dịch để sinh ra kháng thể, kháng thể này được bảo vệ.

35.4.3. Đặc điểm gây bệnh

Yếu tố gây bệnh: độc tính của *B. anthracis* phụ thuộc vào (*a*) capsule vi khuẩn và (*b*) phức độc tố gây bệnh than. Chi tiết về các yếu tố gây độc của *B. anthracis* được tóm tắt tại Bảng 35.2.

Capsule: capsule có cấu tạo dạng poly-D-glutamyl thì không gây độc. Tuy nhiên capsule này bảo vệ tế bào chống lại các thành phần diệt khuẩn của huyết thanh và của thực bào và giúp chống lại sự nhúng chìm của thực bào. Vai trò quan trọng của capsule thể hiện qua những đặc điểm sau: (i). Đóng vai trò rất quan trọng trong việc phát sinh bệnh của vi khuẩn gây bệnh than. (ii). Có vai trò quan trọng nhất trong quá trình thiết lập sự xâm nhiễm và (iii). Capsule có vai trò ít quan trọng hơn ở những giai đoạn cuối của bệnh, vì ở giai đoạn này bệnh là do độc tố gây bệnh than gây ra.

Phức hợp độc tố gây bệnh than: độc tố gây bệnh than là ngoại độc tố và là độc tố tự nhiên. Phức hợp độc tố gây bệnh than gồm ba thành phần: (*i*) kháng nguyên bảo vệ (PA), (*ii*) yếu tố gây phù (EF) và (*iii*) yếu tố gây chết (LF).

Kháng nguyên bảo vệ: PA là một protein có trọng lượng phân tử 82,7 kDa. Được

gọi là PA vì kháng thể chống lại kháng nguyên này được bảo vệ để tấn công protein gây bệnh than. PA là vùng liên kết (B) của độc tố gây bệnh than và cần thiết cho vi khuẩn xâm nhập vào tế bào chủ. Kháng nguyên này tạo cầu nối với thụ thể trên các tế bào thuộc mô mục tiêu. Khi cầu nối được hình thành, một mảnh được phân cắt để tự do phơi nhiễm với vị trí liên kết bổ sung. Vị trí bổ sung này có thể kết hợp với EF để hình thành độc tố gây phù hoặc với yếu tố gây chết LF để hình thành độc tố gây chết.

Bảng 35.2. Yếu tố độc của *Bacillus anthracis*.

Yếu tố độc	**Chức năng sinh học**
Capsule	Bảo vệ vi khuẩn than chống lại sự thực bào và phân giải của bạch cầu leukocyte. Trong trường hợp bị thực bào nhúng chìm, capsule sẽ giúp tế bào vi khuẩn kháng lại sự tiêu diệt và tiêu hóa bên trong thực bào.
Phức hợp độc tố gây bệnh than	Phức hợp độc tố gây bệnh than được mã hóa trên plasmid là phức hợp gồm ba protein sau:
(*i*) kháng nguyên bảo vệ (PA)	Giúp trực khuẩn xâm nhập vào tế bào chủ. Tạo cầu nối giữa phức hợp độc tố với thụ thể trên bề mặt đại thực bào.
(*ii*) yếu tố gây phù (EF)	Gây phù tế bào ở mô mục tiêu và cũng ức chế chức năng của bạch cầu trung tính. Ngăn chặn con đường adenyl cyclase trong tế bào.
(*iii*). Yếu tố gây chết (LF)	Phóng thích yếu tố gây hoại tử khối u -1 và interleukin-1 nhờ các đại thực bào.

Yếu tố gây phù: yếu tố gây phù (EF) là một protein có trọng lượng phân tử 88,9 kDa. Nó là một thành phần của độc tố gây bệnh phù. Yếu tố gây phù là một enzyme adenylate cyclase phụ thuộc calmodulin, chúng hoạt động bằng cách chuyển đổi adenosine triphosphate (ATP) adenosine monophosphate vòng (cAMP). Điều này làm tăng mức cAMP nội bào, dẫn đến làm phù tế bào ở các mô mục tiêu. Yếu tố gây phù cũng ức chế chức năng bạch cầu trung tính và làm sản sinh thấp hơn yếu tố gây hoại tử khối u alpha (TNF-alpha) và interleukin-6 (IL-6) từ bạch cầu đơn nhân.

Yếu tố gây chết: LF là một protein có trọng lượng phân tử 90,2 kDa. Nó là một

metalloprotease kẽm làm bất hoạt protein kinase hoạt hóa mitogen (mitogen-activated protein kinase), làm ức chế sự truyền tín hiệu nội bào. Yếu tố gây chết kích thích sự phóng thích TNF-alpha và interleukin-1 (IL-1) từ các đại thực bào. Cơ chế này được cho là góp phần dẫn đến cái chết bất thình lình do tác động của độc tố xảy ra ở động vật do du khuẩn huyết (bacteremia) cao. Các tác động cục bộ và gây chết do nhiễm trùng là do độc tố được tạo ra từ vi khuẩn *B. anthracis*.

Phát sinh bệnh than: liều bán gây chết (LD_{50}) qua đường hít vào ở người ước khoảng 2.500 - 55.000 bào tử của trực khuẩn xâm nhiễm. Số liệu này thu được là nhờ ngoại suy từ dữ liệu thực nghiệm xâm nhiễm trên khỉ (Bảng 35.3).

Bảng 35.3. Liều xâm nhiễm của *B. anthracis* và liều gây chết của độc tố gây ra cho nhiều động vật khác nhau.

Động vật	Liều xâm nhiễm	Liều độc tố gây chết	Tế bào vi khuẩn/ ml tại thời điểm chết
Chuột đồng	5 tế bào	1000 đơn vị /kg	10^7
Khỉ	3.10^3 tế bào	2500 đơn vị /kg	10^7
Chuột cống	10^6 tế bào	15 đơn vị /kg	10^5

Bào tử bắt đầu tiến trình bệnh theo các cách như sau:

(1). Bào tử sau khi được các đại thực bào nuốt vào, tại vị trí xâm nhập chúng sẽ nảy mầm hình thành dạng tế bào dinh dưỡng của vi khuẩn.

(2). Vi khuẩn gây bệnh than nhân lên tại vị trí xâm nhiễm cùng với đó là sản sinh ra capsule và độc tố. Các thực bào di chuyển vi khuẩn nhưng trực khuẩn than kháng lại sự nhúng chìm của thực bào hay nếu bị nhúng chìm, chúng sẽ kháng lại sự tiêu diệt và tiêu hóa của thực bào. Độc tố gây bệnh than sẽ làm suy yếu hoạt tính thực bào và độc tố này sẽ tác động gây chết lên bạch cầu leukocyte, bao gồm cả thực bào.

(3). Kháng nguyên bảo vệ có trọng lượng phân tử 83 kDa của *B. anthracis* được hoạt hóa sẽ tạo cầu nối với các thụ thể chuyên biệt trên bề mặt tế bào chủ, nhờ đó tạo ra vị trí liên kết thứ cấp cho LF và EF cạnh tranh và liên kết, dẫn đến hình thành độc tố gây chết và độc tố gây phù tương ứng. Độc tố gây chết hay độc tố phù được tiếp nhận nhờ quá trình nhập bào. Tiếp đến sau khi acid hóa endosome, độc tố gây chết hoặc độc gây

phù sẽ đi qua màng vào trong cytosol thông qua kênh dẫn truyền ion trung gian qua PA (PA-mediated ion-conductive channel). Độc tố gây phù sinh ra chứng phù đặc trưng của bệnh than. Sau đó vi khuẩn và độc tố của chúng xâm nhập vào tuần hoàn gây bệnh toàn thân.

(4). Vi khuẩn nhân lên một cách cục bộ và có thể xâm nhập vào máu hoặc các cơ quan khác ví dụ như gan, lách và thận thông qua mạch bạch huyết ly tâm. Sự hiện diện của trực khuẩn than trong các mao quản tại vị trí nhiễm là đặc trưng thấy được của bệnh than. Trực khuẩn này được tìm thấy trong các mao quản của các cơ quan bị chúng xâm lấn như da, lách, hoặc phổi. Sự phát tán vi khuẩn từ các cơ quan này trở vào máu có thể làm du khuẩn huyết (bacteremia). Trong bệnh than nhiễm trùng huyết, triệu chứng xuất huyết có thể phát triển ở bất cứ nơi nào của cơ thể. Tác động cục bộ và gây chết của bệnh là do độc tố của vi khuẩn *B. anthracis* gây ra.

Triệu chứng bệnh: tên bệnh than là "Anthrax" có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp dùng để chỉ về than. Bệnh than ở người có những kiểu lâm sàng sau: (*a*) bệnh than ở da, (*b*) bệnh than ở dạ dày ruột và (*c*) bệnh than do hít vào và (*d*) viêm màng não than.

Bệnh than ở da: bệnh than ở da là dạng phổ biến nhất của bệnh than và chiếm trên 95% bệnh than xuất hiện trong tự nhiên. Bệnh là do bào tử xâm nhập qua da bị rách, trầy sướt hay do vết cắn của ruồi. Vị trí bệnh thường xuất hiện trên mặt, cổ hoặc cánh tay. Bệnh này thường phát hiện ở những người nông dân và những người xử lý thịt gia súc bị nhiễm. Bệnh than ở da có thể tiến triển qua các giai đoạn sau:

Xuất hiện nốt sần: tổn thương bắt đầu xuất hiện nốt sần có cảm giác đau, ngứa tại vị trí da có bào tử cấy vào. Nốt sần là tổn thương ban đầu, sau đó sẽ trở thành túi bọc có đường kính từ 1 - 2 cm trong vòng 2 ngày.

Túi bọc: túi bọc này chứa một lượng lớn vi khuẩn Gram dương có hoặc không có một lượng lớn dịch huyết thanh và rất hiếm khi có bạch cầu leukocyte. Phù ấn không lõm thường bao xung quanh vị trí tổn thương. Túi này rộng ra và có thể có các túi vệ tinh xuất hiện. Tiếp đến túi vỡ ra, gây hoại tử và lớn ra, hình thành lở loét, phủ lên trên là vảy có màu đen đặc trưng nên được gọi bệnh than (Hình 35. 10). Từ "than" xuất phát từ vảy có màu đen.

Vảy: da trong khu vực xung quanh vị trí tổn thương trung tâm có thể bị phù và hoại tử nhưng không có mủ. Tổn thương này được gọi là nốt ác tính là do hình dạng vảy đặc trưng; tuy nhiên những tổn thương này hoặc là ác tính hoặc là có mủ. Bệnh sẽ gây đau, nhưng đôi khi lại xuất hiện cảm giác ngứa nhẹ. Đôi khi có nhiều nốt phát triển cùng với tác động do độc tố tạo ra, các tổn thương đặc biệt trên mặt hoặc ở cổ trở nên phù ở mức độ rộng lớn. Bệnh than ở da có thể tự lành, vảy sẽ khô đi và rơi ra trong vòng 1 - 2 tuần, để lại sẹo rất nhỏ. Bệnh than ở da thường cục bộ. Khi không được điều trị, bệnh sẽ lan vào máu và phát tán gây nhiễm trùng toàn thân. Trường hợp này chiếm 1/5 các ca bệnh than da. Sử dụng kháng sinh nhằm ngăn chặn phát tán sự nhiễm trùng. Nếu được điều trị tỷ lệ chết do bệnh than ở da chỉ chiếm khoảng 1%.

Hình 35.10. Tổn thương do bệnh than xảy ra trên da ở cẳng tay bệnh nhân do *Bacillus anthracis* gây ra. Bệnh có biểu hiện như da lở loét, tổn thương bắt đầu chuyển sang đen (CDC).

Bệnh than ở dạ dày ruột: bệnh này là do ăn phải thịt chưa được nấu chín có nhiễm bào tử gây bệnh than. Đau bụng và sốt là những triệu chứng xuất hiện đầu tiên sau 2 - 5 ngày tiêu thụ phải thực phẩm bị nhiễm. Sau đó xuất hiện các triệu chứng buồn nôn, nôn mữa và tiêu chảy.

Bào tử than xâm lấn vào niêm mạc của tuyến dạ dày ruột và tiếp cận với hạch bạch huyết mạc ruột treo (reach mesenteric lymph node). Sau khi vào hạch bạch huyết, bào tử này sẽ nẩy mầm thành dạng tế bào dinh dưỡng và bắt đầu nhân lên, gây tắt hệ bạch huyết. Điều này dẫn đến làm trương cổ trướng (ascite), viêm hạch xuất huyết (hemorrhagic adenitis), trương phồng dạ dày và ruột.

Các lưu ý về bệnh than dạ dày ruột: (a). Loét là tổn thương ruột ban đầu và chủ yếu xuất hiện ở đoạn cuối hồi tràng hay manh tràng (cecum). (b). Trong một số trường hợp, hoại tử và lở loét tại vị trí xâm nhiễm sẽ tạo ra xuất huyết dạ dày ruột, dẫn đến tiêu

chảy ra máu. (c). Độc tố gây bệnh than cũng có thể dẫn đến suy thận. (d). Nếu không sử dụng liệu pháp kháng sinh sẽ gây chết nhanh chóng. Tỷ lệ gây chết rất cao và luôn luôn trên 50%.

Bệnh than ở hầu miệng là một biến thể của bệnh than đường tiêu hóa và xảy ra ở hầu miệng sau khi tiêu thụ phải sản phẩm thịt bị nhiễm khuẩn than. Đặc trưng của bệnh này là đau họng và khó nuốt. Tổn thương tại vị trí cổng vào của họng miệng tương tự như lở loét da.

Bệnh than do hít vào: bệnh than do hít vào còn được biết là bệnh của những người sản xuất len. Bệnh xuất hiện sau khi hít phải bào tử vào phổi. Các bào tử này hiện diện trong bụi hay trong sợi len của động vật bị nhiễm, nguy cơ nhiễm cao nhất xảy ra ở những người trong nhà máy sản xuất len. Bào tử được các đại thực bào ở túi phổi ăn vào và được mang tới hạch bạch huyết thuộc trung thất (mediastinal lymph node). Bệnh than ở phổi không gây viêm phổi, nhưng nó làm viêm trung thất xuất huyết (hemorrhagic mediastinitis) và phù phổi (pulmonary edema). Đặc trưng của bệnh than do hít vào là bệnh hai pha. Trong đó: (a). Pha thứ nhất xảy ra đột ngột sau 1 - 6 ngày ủ, bệnh xuất hiện không đặc trưng gồm sốt nhẹ và không gây ho. (b). Pha hai xảy ra từ 24 - 48 giờ sau khi pha một xuất hiện, bệnh sẽ trở nên rõ ràng hơn. Pha này biểu hiện sốt cao, khó thở, thở nhanh, toát mồ hôi và thổ huyết (hematemesis). Bệnh tiến triển nhanh chóng đến triệu chứng viêm cuống phổi xuất huyết (hemorrhagic bronchopneumonia) đặc trưng, cùng với đó là sốc và hạ nhiệt. Bệnh có thể gây chết trong vòng 24 - 36 giờ và bệnh này có tỷ lệ chết cao.

Viêm màng não than: viêm màng não than có thể xảy ra phổ biến như là kết quả của du khuẩn huyết từ bệnh than qua đường hô hấp do hít vào nhưng lại ít biểu hiện triệu chứng bệnh than hơn. Màng não xuất hiện các triệu chứng đặc trưng như xuất huyết và phù. Khi xét nghiệm dịch não tủy thường thấy xuất huyết và chứng tăng lympho đa nhân (polymorphonuclear pleocytosis). Một lượng lớn trực khuẩn Gram dương, có capsule có trong dịch não tủy. Tỷ lệ chết là 100% nhưng đôi khi bệnh nhân được điều trị bằng kháng sinh sẽ sống sót.

35.4.4. Miễn dịch của cơ thể chủ

Bệnh than chủ yếu là bệnh ở động vật. Động vật ăn cỏ ví dụ như gia súc, cừu và ngựa là những động vật nhạy cảm với bệnh. Chuột, gà, bồ câu và chó có khả năng kháng bệnh cao. Chim, kền kền cũng có khả năng kháng được bệnh than nhưng có thể làm lan truyền bào tử từ móng vuốt và mỏ của chúng. Người là động vật trung gian nhạy cảm với *B. anthracis*. Động vật tồn tại trong tự nhiên mắc phải bệnh than sẽ miễn dịch với sự tái nhiễm nghĩa là không bị mắc bệnh than nữa. Bệnh tấn công lần thứ hai thì cực kỳ hiếm. Sự miễn dịch lâu dài đối với bệnh than có được là nhờ kháng thể chuyên biệt (*a*) đối với độc tố gây bệnh than và (*b*) đối với capsule dạng polypeptide. Kháng thể chống lại độc tố gây bệnh than chủ yếu chống lại PA được bảo vệ.

35.4.5. Dịch tể học

Phân bố về địa lý: vi khuẩn gây bệnh than gần như phân bố khắp nơi trên thế giới, xuất hiện trong đất ở dạng bào tử cực kỳ kháng. Các bào tử này gây bệnh cho người, vật nuôi và động vật hoang dã do ăn cỏ trên vùng đất bị nhiễm hoặc do tiêu thụ phải thức ăn bị nhiễm. Hàng năm trên thế giới có khoảng 20.000 - 100.000 trường hợp mắc phải.

Bệnh thường ghi nhận ở Trung Đông, Châu Phi, Châu Á và Mỹ La Tinh. Bệnh than ở người bộc phát thành dịch đã được báo cáo ở Nga và Zimbabwe và Ấn Độ.

35.4.6. Môi trường sống

Bào tử *B. anthracis* đầy rẫy trong đất, nước và không khí.

35.4.7. Nguồn và sự lan truyền bệnh

Động vật bị nhiễm là nguồn bệnh. Bệnh than ở người chủ yếu là bệnh được lan truyền từ động vật. Động vật bị nhiễm hoặc sản phẩm động vật bị nhiễm như da, len, lông, răng nanh và thịt bị nhiễm nấu chưa chín là nguồn lây nhiễm quan trọng. Người mắc phải bệnh than là do: (1). Tiếp xúc gần với động vật bị nhiễm hay sản phẩm động vật bị nhiễm sẽ gây bệnh than ở da. (2). Tiêu thụ thịt bị nhiễm nấu chưa chín có chứa bào tử than sẽ gây bệnh than cho dạ dày ruột. (3). Hít vào các giọt khí có bào tử than, thường có liên quan đến môi trường chế biến da và len sẽ gây bệnh than qua đường hô hấp.

35.4.8. Vi khuẩn than và chiến tranh sinh học

Do vi khuẩn than (1). Có thể được sử dụng để tạo ra các sol khí chứa bào tử vi khuẩn than làm vũ khí dùng để khủng bố sinh học. (2). Bào tử của *B. anthracis* có thể

được tạo ra và bảo quản trong điều kiện khô nhưng vẫn lưu giữ được sự sống trong nhiều thập kỹ. (3). Nhiều quốc gia có khả năng chế tạo vũ khí bằng bào tử *B. anthracis*. (4). Kẻ khủng bố trong nước có thể phát triển phương tiện để phát tán bào tử thông qua tấn công trên diện rộng hoặc tấn công ở quy mô nhỏ. (5). Bào tử được sử dụng làm vũ khí trong khủng bố sinh học có thể phát tán trên diện rộng qua sol khí hoặc bằng cách phát tán hạn chế như làm nhiễm thư từ và bao gói.

Khả năng sử dụng bào tử than trong khủng bố sinh học ngày nay là mối quan tâm chính. Từ tháng Mười 2001, ít nhất có 22 trường hợp đã được khẳng định hoặc nghi ngờ xâm nhiễm vi khuẩn than đã được xác định ở Hoa Kỳ.

Bệnh than lây lan trực tiếp từ người sang người thì rất hiếm. Động vật bị nhiễm thải ra một lượng lớn bacillus từ đường miệng, mũi và trực tràng. Các vi khuẩn này sinh bào tử trong đất và vẫn còn sống sót trong thời gian dài. Đất bị ô nhiễm là nguồn quan trong làm động vật bị nhiễm. Sự xâm nhiễm xuất hiện ở động vật nhạy cảm do chúng nuốt phải bào tử có trong đất.

35.4.9. Phương pháp phát hiện

Tại phòng thí nghiệm, phải thiết lập hướng dẫn an toàn về phòng thí nghiệm sinh học cấp II và thực hiện hướng dẫn này trong khi xử lý các mẫu bệnh phẩm nghi ngờ bệnh than.

Mẫu thử: mẫu thử gồm: (a). Dịch từ túi bọng, dịch dưới vảy đen do bệnh than ở da gây ra; (b). Máu, hạch bạch huyết hoặc dịch hút từ lá lách trong bệnh than nhiễm trùng huyết và bệnh than do hít vào; (c). Dịch não tủy ở bệnh nhân viêm màng não than và (d). Đờm và máu ở bệnh than do hít vào.

Soi dưới kính hiển vi: mẫu kính phết được nhuộm với chất nhuộm Gram, xanh polychrome methylene còn gọi là nhuộm McFadyean và chất nhuộm Giemsa:

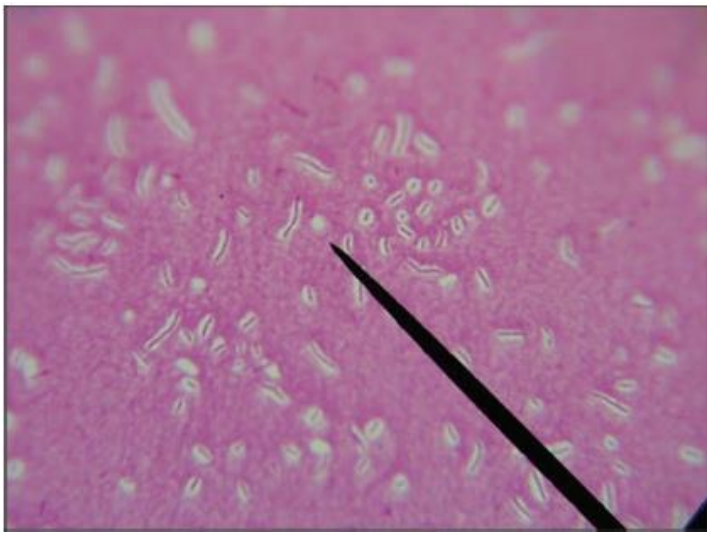
(a). Nhuộm Gram tiến hành cho mẫu lấy từ tổn thương da (dịch từ túi hay vảy), dịch não tuỷ hay máu sẽ thấy được trực khuẩn Gram dương, kích thước lớn, có capsule, ở dạng tế bào đơn, cặp đôi và chuỗi ngắn. Trực khuẩn này không biểu hiện có bào tử. Qua kỹ thuật nhuộm Gram có thể xác định ban đầu vi khuẩn than.

(b). Khi nhuộm bằng Giemsa, trực khuẩn có màu tía xung quanh là capsule màu

đỏ.

(c). Nhuộm trãi mẫu máu trên lam với xanh polychrome methylene, trực khuẩn biểu hiện như vật có màu tía không định hình, vẫn thấy được capsule bao xung quanh tế bào vi khuẩn. Phản ứng này được gọi là phản ứng McFadyean và được sử dụng để chẩn đoán ban đầu khuẩn than ở động vật.

Nuôi cấy: mẫu thử được nuôi cấy trên môi trường thạch máu hoặc môi trường thạch dinh dưỡng hoặc trên môi trường chọn lọc chuyên biệt dùng để phân lập *B. anthracis*. Môi trường Knisely's PLET (polymyxin B - lysozyme - EDTA – thallous acetate) được sử dụng để phân lập chọn lọc vi khuẩn *B. anthracis* từ đất và mẫu bệnh phẩm có nhiều vi khuẩn khác có bào tử.



Hình 35.11. Ảnh nhuộm xanh polychrome methylene bacillus (1000X) biểu hiện như một vật có màu tía không định hình, thấy được capsule bao xung quanh tế bào vi khuẩn được gọi là phản ứng McFadyean (Subhash Chandra Parija)

Xác định vi khuẩn: khuẩn lạc không tiêu huyết trên môi trường thạch máu và có hình dạng khuẩn lạc trông giống như đầu sứa là đặc điểm của vi khuẩn *B. anthracis*. Đặc điểm khác nhau dùng để phân biệt *B. anthracis* với các loài *Bacillus* có quan hệ gần như sau: *Bacillus anthracis* có các đặc điểm:

(a). Khuẩn lạc có dạng trông giống hình đầu sứa,

(b). Không tiêu huyết trên môi trường thạch máu,

(c). Khuẩn lạc nhầy trên môi trường thạch máu,

(d). Khuẩn này không tăng trưởng trên môi trường thạch chloral hydrate,

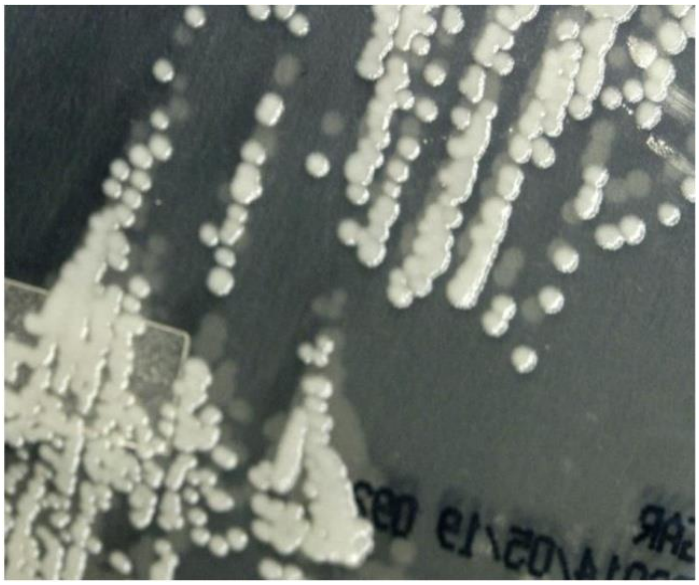
(e). Vi khuẩn Gram dương, hình que, hình thành nội bào tử,

(f). Là vi khuẩn không di động có capsule,

(g). Phân giải do phage gamma cho kết quả dương tính,

(h). Thử nghiệm chuỗi hạt ngọc trai cho kết quả dương.

Cấy vào động vật: *B. anthracis* có thể được phân lập bằng cách thu thập mẫu từ mô bị nhiễm và đưa chúng lên các vị trí da đã được cạo của chuột lang. Vi khuẩn hiện diện trong mẫu vật sẽ xâm nhập vào da thông qua các chổ trầy xướt. Sau đó trực khuẩn than sẽ được chứng minh hiện diện trong nước bọt và trong máu của động vật thí nghiệm, chuột thí nghiệm sẽ chết sau 2 - 3 ngày cấy khuẩn.



Hình 35.12. Khuẩn lạc của chủng Sterne *Bacillus anthracis*, trên môi trường thạch polymyxin B - lysozyme - EDTA – thallous acetate (PLET) sau 24 giờ ủ ở 37°C (CDC).

Chẩn đoán bằng huyết thanh: chẩn đoán vi khuẩn bằng huyết thanh được dựa trên việc chứng minh kháng thể chống lại kháng nguyên bảo vệ (PA) có trong huyết thanh bệnh nhân. Khuếch tán trên gel, cố định bổ thể, ngưng kết hồng cầu gián tiếp và phương pháp miễn dịch dựa trên enzyem liên kết (ELISA) là những thử nghiệm được sử dụng để chứng minh kháng thể có trong huyết thanh. Hiện nay thử nghiệm ELISA được sử dụng để chứng minh IgG huyết thanh chống lại PA. Thử nghiệm này có độ nhạy là 98,6% và đặc hiệu đạt 80%. Kháng thể kháng IgG chuyên biệt kháng PA được phát hiện sớm trong vòng 10 ngày sau khi triệu chứng bệnh xuất hiện nhưng mức IgG cao chỉ quan sát được sau 40 ngày xuất hiện triệu chứng.

Thử nghiệm nhiệt ngưng kết tố Ascoli (Ascoli's thermoprecipitation) chủ yếu được sử dụng để chẩn đoán nhanh khi mô bị thối và trực khuẩn than không phát hiện được. Các mô này được nghiền nhỏ trong nước muối và luộc trong 5 phút sau đó lọc. Khi dịch chiết này được phủ lên huyết thanh kháng than trong ống nghiệm có đường kính hẹp, thử nghiệm được xem là dương tính nếu xuất hiện vòng trầm hiện tại vị trí nối của

hai dung dịch lỏng trong vòng 5 phút.

35.4.10. Điều trị

B. anthracis thường nhạy với penicillin; vì vậy trước đây penicillin G là lựa chọn đầu tiên để điều trị. Penicillin như amoxicillin hay amoxicillin/clavulanic acid là những kháng sinh hiệu quả để điều trị vi khuẩn than ở da. Nhưng từ năm 2001, ciprofloxacin hay doxycycline thường được khuyến cáo sử dụng thay cho penicillin là do các chủng vi khuẩn than có khả năng kháng penicillin. Bệnh nhân bị bệnh than qua đường hô hấp cần được sử dụng chế điều trị đa thuốc kết hợp nhằm tăng cường hiệu quả hoặc là ciprofloxacin hoặc là doxycycline cùng với đó là ít nhất thêm một kháng sinh nữa như vancomycin, imipenem, meropenem, chloramphenicol, rifampin, tetracycline, clindamycin và aminoglycoside. Ciprofloxacin hay doxycycline trong 60 ngày thì hiệu quả để chống lại bệnh than ở tuyến dạ dày ruột. Doxycycline không thích hợp để sử dụng trong trường hợp nghi ngờ than màng não, bởi vì khả năng xâm nhập kém của kháng sinh này vào hệ thần kinh truong ương.

B. anthracis kháng được nhóm sulfonamide và cephalosporin phổ rộng. Liệu pháp kháng sinh sẽ tiêu diệt vi khuẩn trong vòng vài giờ nhưng các triệu chứng lâm sàng của bệnh vẫn còn do tác động của độc tố than. Sử dụng kháng sinh sẽ không hiệu quả khi độc tố được hình thành. Tuy nhiên kháng sinh có thể làm giảm tỷ lệ tử vong.

35.4.11. Phòng ngừa và kiểm soát

Các biện pháp này bao gồm (*a*) phòng bệnh hóa học sử dụng kháng sinh, (*b*) phòng bệnh miễn dịch bằng tiêm chủng vaccin và (*c*) khử trùng các sản phẩm động vật.

Phòng bệnh hóa học: phòng bệnh hóa học thực hiện đối với những người bị phơi nhiễm với vi khuẩn than nhưng không xuất hiện triệu chứng bệnh. Biện pháp này hữu dụng để làm giảm nguy cơ bệnh tiến triển do hít phải bào tử vi khuẩn than. Sử dụng ciprofloxacin, tetracycline bao gồm doxycycline hay penicillin trong vòng 60 ngày thì hiệu quả.

Phòng bệnh miễn dịch: phòng bệnh miễn dịch gồn tiêm chủng cho động vật và người.

Vaccin cho động vật: kiểm soát bệnh than ở động vật thì cần thiết để ngăn chặn

sự lan truyền bệnh xâm nhiễm vào người. Vaccine gồm bacillus đã được làm chết và/hoặc kháng nguyên capsule thì không tạo miễn dịch đáng kể. Sử dụng vaccine dạng chủng gây độc không có capsule thì hiệu quả để tiêm chủng cho động vật nuôi. Vaccine Sterne chứa bào tử chủng *B. anthracis* đột biến không có capsule, không độc tạo ra một lượng độc tố dưới mức gây chết sẽ cảm ứng hình thành kháng thể bảo vệ. Động vật được bảo vệ trong vòng một năm khi được tiêm bằng vaccine có bào tử. Vaccine này được sử dụng rộng rãi cho động vật; tuy nhiên nó không an toàn cho người sử dụng. Sự tiêm chủng vaccine cho động vật được sử dụng cũng nhằm: (*i*) để bảo vệ con người sống trong khu vực có dịch bệnh và (*ii*) bảo vệ những người đang tiếp xúc với động vật và sản phẩm động vật.

Vaccine cho người: hiện nay vaccine than không có tế bào dùng cho người còn gọi là vaccine than hấp phụ (AVA) có sẵn, sử dụng cho những cá thể có nguy cơ nhiễm bệnh cao. Vaccine này sử dụng chủng *B. anthracis* không độc, không có capsule để tạo kháng thể PA trong quá trình tăng trưởng tích cực.

Tiêm chủng than gồm ba liều tiêm dưới da trong vòng 2 tuần và sau đó tiêm thêm 3 liều dưới da nữa sau 6, 12 và 18 tháng. Tiêm nhắc lại hàng năm để duy trì sự miễn dịch.

Vaccine này được khuyến cáo sử dụng như là một phần điều trị sau phơi nhiễm ở những cá thể khoẻ mạnh có độ tuổi từ 18 đến 65, những người có nguy cơ phơi nhiễm với vi khuẩn than.

Khử nhiễm các sản phẩm động vật: các biện pháp này bao gồm thanh trùng các sản phẩm động vật như len, da, ... và cải thiện vệ sinh cá nhân.

35.5. Trực khuẩn gây nhọt

35.5.1. Giới thiệu

Các loài *Bacillus* giống như *B. anthracis* thường được gọi là trực khuẩn gây nhọt hay trực khuẩn giả than (pseudoanthrax). Đây là những vi khuẩn gây bệnh cơ hội có độc lực thấp. Nhóm này thì phong phú, có mặt khắp nơi trong tất cả môi trường. Một số trong nhóm này thường ô nhiễm trong phòng thí nghiệm.

B. cereus là vi khuẩn gây bệnh quan trọng nhất gây nhiễm trùng GI, nhiễm trùng mắt và nhiễm trùng liên quan đến đặt ống thông.

Bacillus subtilis có thể là vi khuẩn gây bệnh cơ hội, gây nhiễm trùng mắt và nhiễm trùng máu.

Bacillus licheniformis cũng gây ngộ độc thực phẩm. Bào tử của *Bacillus stearothermophilus* được sử dụng để thử nghiệm hiệu lực của sự thanh trùng bằng nồi hấp. Một số loài *Bacillus* được sử dụng để sản xuất kháng sinh như bacitracin, tyrothricin và polymyxin.

35.5.2. Bacillus *cereus*

B. cereus là trực khuẩn Gram dương, hình thành bào tử. Khuẩn này thường di động bằng tiên mao tuy nhiên một số chủng lại không có khả năng di động (Hình 35.13). *B. cereus* là vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, không có nhu cầu khắc khe về dinh dưỡng và tăng trưởng tốt trên môi trường bình thường như môi trường thạch dinh dưỡng.

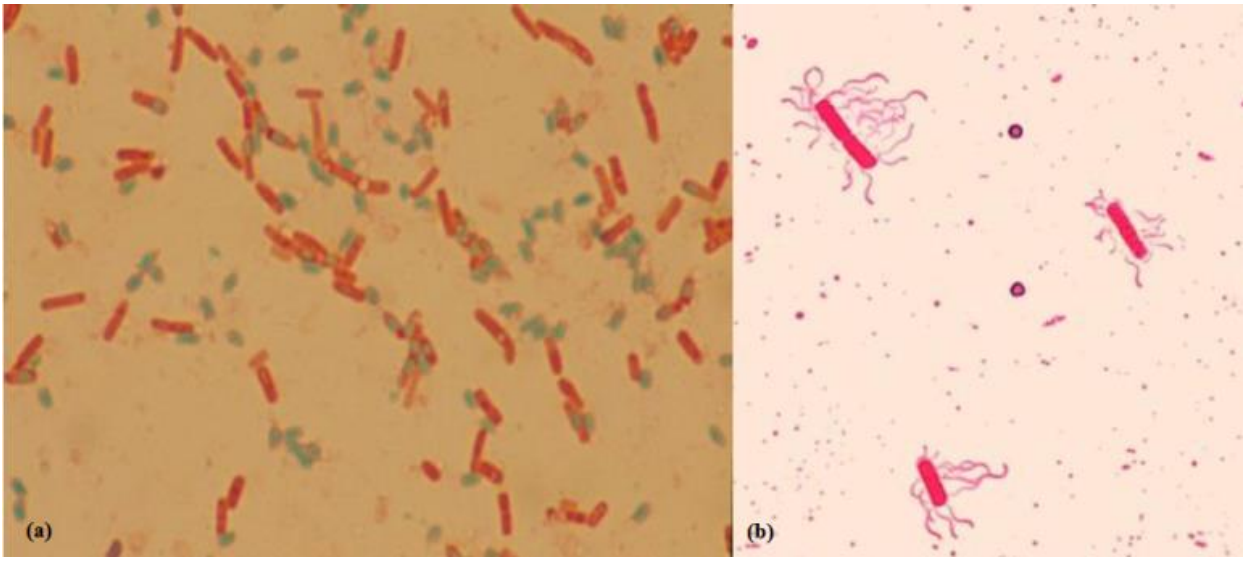
B. cereus là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm. Khuẩn này phân bố rộng khắp trong đất và thường được phân lập từ thực phẩm như ngũ cốc, sữa, gia vị, rau thịt và thịt gia cầm cũng như nhiều loại thực phẩm chế biến khác. Các bằng chứng về ngộ độc thực phẩm do *B. cereus* xuất hiện rãi rác khắp nơi trên thế giới. Ngộ độc thực phẩm xảy ra là do tiêu thụ phải thức ăn bị nhiễm khuẩn *B.* cereus với hàm lượng đủ để gây ngộ độc, hoặc vi khuẩn xâm nhiễm vào thực phẩm ăn liền và nhân lên đủ lượng để gây ngộ độc. Ngộ độc thực phẩm do *B. cereus* có thể xảy ra khi thực phẩm được chế biến và bảo quản không đủ lạnh trong nhiều giờ trước khi sử dụng, liều gây ngộ độc của *B. cereus* đạt $>10^6$ tế bào/g. Thực phẩm làm bùng nổ ngộ độc trong thời gian qua gồm thịt qua nấu chín và rau, cơm hoặc cơm chiên, súp vanilla, món sữa trứng, súp và rau mầm.

Có hai kiểu bệnh do tiêu thụ thực phẩm nhiễm *B. cereus*.

(a). Thứ nhất được biết rõ hơn là triệu chứng đau bụng và tiêu chảy không ra máu; thời gian ủ bệnh từ 4 - 16 giờ sau khi nuối phải vi khuẩn và thời gian triệu chứng kéo dài 12 - 24 giờ.

(b). Thứ hai bệnh có đặc điểm do sự tấn công cấp tính các triệu chứng như buồn nôn và nôn mữa, xảy ra trong vòng 1 - 5 giờ sau khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm; tiêu chảy thì không phải là đặc điểm phổ biến trong kiểu này.

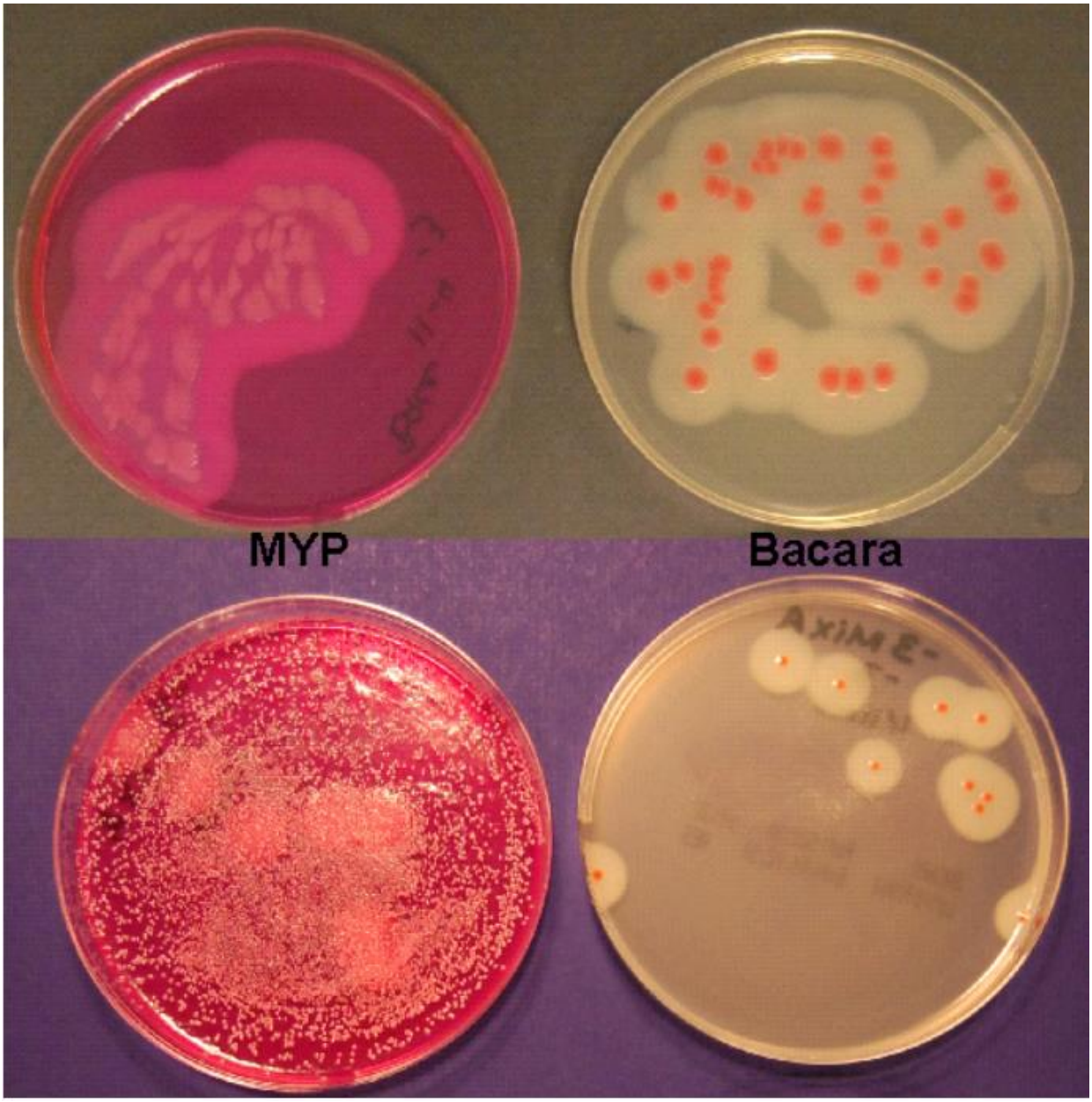
Môi trường thạch MYPA có các thành phần mannitol, egg yolk, polymyxin, chỉ thị phenol red là môi trường chọn lọc tiêu chuẩn dùng để phân lập *B. cereus*. Khuẩn này lên men được glucose, nhưng không có khả năng lên men được mannitol và *B. cereus* sản sinh ra enzyme lecithinase. Tuy nhiên môi trường MYPA ít có tính chọn lọc đối với hệ vi khuẩn nền là do hệ vi khuẩn nền này không bị ức chế và vì thế có thể làm che lấp đi sự có mặt *B. cereus.*



Hình 35.13. (a). Ảnh nhuộm bào tử *Bacillus cereus* (K. Todar); (b). Ảnh nhuộm tiên mao *Bacillus cereus* bằng chất nhuộm Leifson (CDC).

Bacara là môi trường thạch tạo màu có tính chọn lọc và phân biệt nhằm thúc đẩy sự tăng trưởng và định danh *B. cereus*. Khác với MYPA, môi trường Bacara ức chế được hệ vi khuẩn nền nên môi trường này được sử dụng để đếm số lượng nhóm *B. cereus* thay thế cho MYPA. *B. cereus* tăng trưởng hình thành khuẩn lạc đồng nhất có màu hồng - cam, bao xung quanh là vòng trầm hiện (Hình 35.14). Việc định danh sẽ bao gồm tất cả các loài từ nhóm *B. cereus*: *B. cereus, B. thuringiensis, B. anthracis, B. mycoides* và *B. weihenstephanensis.* Thử nghiệm sinh hóa cần thiết để xác định ở mức độ loài.

Bào tử *B. cereus* có thể sống sót trong đất trong một thời gian dài. Khuẩn này giống như *B. anthracis* nhưng khác nhau một số đặc điểm được đề cập trong Bảng 35.4. *B. cereus* sản sinh ra nhiều độc tố và enzyme, các yếu tố này gây ra nhiều triệu chứng sau:



Hình 35.14. Khuẩn lạc *B. cereus* trên môi trường MYPA có màu hồng và có lecithinase dương, nhưng các vi khuẩn khác không bị ức chế và có thể làm cản trở việc phân lập *B. cereus*. Khuẩn lạc *B. cereus* trên môi trường Bacara có màu hồng - cam và có lecithinase dương, các vi khuẩn khác bị ức chế (BAM, FDA).

(1) Nội độc tố không bền nhiệt tương tự như nội độc tố do *Vibrio cholerae* và *Escherichia coli* tạo ra. Độc tố này kích thích hệ adenyl cyclase-cAMP gây tiêu chảy ra nước ào ạt. Giống như nội độc tố khác, độc tố này làm tích lũy dịch trong thí nghiệm thắt vòng hồi tràng ở thỏ. Độc tố này gây tiêu chảy là một dạng ngộ độc thực phẩm do *B.*

cereus gây ra.

(2) Nội độc tố bền nhiệt gây nôn mửa là một dạng ngộ độc thực phẩm do *B. cereus*, nhưng cơ chế tấn công chính xác của độc tố này chưa được hiểu rõ.

B. cereus cũng sản sinh ra ít nhất ba độc tố khác đó là: (*a*) cerolysin một dạng độc tố có khả năng tiêu huyết; (*b*) độc tố gây hoại tử, không bền nhiệt và (*c*) phospholipase C là enzyme lecithinase. Các độc tố này được cho là gây ra nhiễm trùng thị giác như chứng viêm toàn mắt (panophthalmitis) do *Bacillus*.

Dạng ngộ độc thực phẩm gây tiêu chảy xảy ra là do nội độc tố không bền nhiệt của *B. cereus*. Người bị ngộ độc là do tiêu thụ thực phẩm như rau, thịt hay nước sốt bị nhiễm khuẩn này. Thời gian ủ bệnh dài khoảng 8 - 12 giờ, trong suốt giai đoạn này vi khuẩn nhân lên và tạo ra độc tố không bền nhiệt. Sau đó xuất hiện các triệu chứng gồm đau bụng, tiêu chảy và buồn nôn, triệu chứng nôn mữa thì hiếm khi xảy ra.

Bệnh thường kéo dài ít nhất 24 giờ hoặc lâu hơn. Mẫu phân chứa một lượng nhỏ *B. cereus*. Ngộ độc thực phẩm gây tiêu chảy là do *B. cereus* có các kiểu huyết thanh 2, 6, 8, 9, 10 hay 12. Ngộ độc thực phẩm gây nôn mữa là do nội độc tố bền nhiệt của *B. cereus* gây ra là do tiêu thụ phải gạo bị nhiễm. Trong quá trình nấu chín gạo ban đầu, hầu hết trực khuẩn bị nhiệt tiêu diệt nhưng các bào tử kháng lại sống sót. Nếu cơm được giữ ở nhiệt độ phòng, bào tử sẽ nảy mầm hình thành tế bào dinh dưỡng, nhân lên và tạo nội độc tố. Nội độc tố kháng được nhiệt sẽ không bị phân hủy khi cơm được hâm nóng. Khi ăn phải cơm nhiễm độc tố này sau khoảng 6 giờ, cơ thể sẽ bị buồn nôn, nôn mữa và đau bụng quặn. Tiêu chảy và sốt hiếm khi xảy ra.

Một lượng lớn vi khuẩn *B. cereus* có trong cơm cũng như có trong mẫu phân của những bệnh nhân bị ngộ độc này. Bệnh thường kéo dài trong thời gian ngắn hơn 24 giờ. Hình thức gây nôn mữa của ngộ độc thực phẩm là do *B. cereus* kiểu huyết thanh 1, 3 hoặc 5 gây ra.

Viêm toàn mắt do bacillus là do chấn thương và bị vật ô nhiễm vi khuẩn từ đất làm tổn thương mắt. Đây là bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng tiến triển nhanh làm mất thị giác trong 48 giờ sau tổn thương. Nhiễm trùng máu do đặt ống tĩnh mạch và viêm màng trong tim là những nhiễm trùng khác do *B. cereus* gây ra ở các bệnh nhân bị suy giảm miễn

dịch. Thực phẩm nghi ngờ bị nhiễm, phân và chất nôn được nuôi cấy trên môi trường bình thường hay môi trường MYPA đặc biệt. Khi nhuộm Gram vi khuẩn từ khuẩn lạc, có thể thấy được trực khuẩn Gram dương có mang bào tử.

Ngộ độc thực phẩm do *B. cereus* thì nhẹ và tự giới hạn, không cần phải điều trị đặc biệt. Các nhiễm trùng do *Bacillus* khác cần thiết phải điều trị bằng kháng sinh. *B. cereus* gây nhiễm trùng khác - biểu thị tỷ lệ mắc phải đa kháng thuốc cao. Khuẩn này kháng được penicillin và cephalosporin nhưng lại nhạy cảm với gentamicin, ciprofloxacin, clindamycin và vancomycin.

Ngộ độc thực phẩm được ngăn chặn bằng cách gia nhiệt đủ để tiêu diệt vi khuẩn, tránh nhiễm chéo cho thực phẩm đã được nấu chín và lưu trữ đúng cách.

Bảng 35.4. Đặc điểm khác biệt giữa *Bacillus anthracis* và *Bacillus cereus.*

Đặc điểm	***Bacillus anthracis***	***Bacillus cereus***
Di động	Không di động	Di động
Capsule	Có	Không
Khuẩn lạc dạng đầu sứa	Có	Không
Phân giải máu trên môi trường thạch máu cừa	Không	Có
Tăng trưởng trên thạch chloral hydrate	Không	Có
Hóa lỏng gelatin	Chậm	Nhanh
Thử nghiệm chuỗi ngọc trai	Dương tính	Âm tính
Phân giải do phage gamma	Dương tính	Âm tính
Phát sinh bệnh trên chuột	Dương tính	Dao động

35.5.3. Chuẩn bị mẫu

Khi phân tích mẫu thực phẩm cần 50 g mẫu với 450 mL BPW (1:10 dilution) đồng nhất trong 2 phút ở tốc độ 10.000-12.000 rpm. Pha loãng mẫu ở nồng độ 10^{-2} - 10^{-6}.

35.5.4. Nuôi cấy *B. cereus*

Sử dụng môi trường thạch Bacara hoặc MYPA để cấy trãi *B. cereus* sau đó ủ các đĩa ở 30°C/18-24 giờ và quan sát khuẩn lạc điển hình có vòng trầm hiện xung quanh là do *B. cereus* sản sinh ra enzyme lecithinase. Trên môi trường thạch Bacara, khuẩn lạc *B. cereus* có màu hồng - cam và hoặc màu hồng trên MYPA và có thể trở nên đậm hơn sau

khi ủ kéo dài (Hình 35.14).

35.5.5. Đếm *B. cereus* bằng phương pháp MPN

MPN là phương pháp thường được sử dụng để khảo sát *B. cereus* có trong sản phẩm với số lượng nhỏ. Phương pháp này cũng hiệu quả để kiểm tra thực phẩm có thể chứa quần thể lớn các loài cạnh tranh hoặc thực phẩm khử nước mà theo đó bào tử sẽ nhiều hơn tế bào dinh dưỡng. Trong trường hợp này đòi hỏi phải bổ sung dinh dưỡng để bào tử nảy mầm. MPN thường sử dụng là 3 dãy ống chứa môi trường lỏng trypticase soy-polymyxin và 3 nồng độ mẫu pha loãng 10^{-1}, 10^{-2} và 10^{-3} sau đó ủ ở 30 $\pm$ 2°C/48 ± 2 giờ và quan sát sự tăng trưởng của *B. cereus* qua độ đục. Cấy trãi các ống đục lên môi trường hoặc Bacara hoặc MYPA và ủ ở 30°C/18 - 24 giờ. Chọn khuẩn lạc điển hình có màu hồng - cam nếu là trên môi trường Bacara hoặc có màu hồng trên môi trường MYPA, có lecithinase dương để khẳng định bằng thử nghiệm sinh hóa và cũng để xác định độc tố đường ruột nếu cần thiết.

Tính MPN số tế bào *B. cereus* /g mẫu dựa trên số ống tại mỗi nồng độ có kết quả khẳng định *B. cereus* dương. Thử nghiệm sinh hóa chỉ xác định ở mức độ loài. Tuy nhiên các loài *Bacillus* spp khác ngoài *B. cereus* có thể có độc tố đường ruột.

35.5.6. Khẳng định *B. cereus*

Chọn 5 khuẩn lạc điển hình chuyển sang môi trường dinh dưỡng thạch nghiêng, ủ ở 30°C/24 giờ. Khi nhuộm Gram, *B. cereus* có Gram dương, dạng trực khuẩn lớn, xếp thành chuỗi ngắn hoặc dài; bào tử có hình khối bầu dục (ellipsoid), tâm gần đầu cuối và không có chổ phồng lên của túi bào tử. Sử dụng các chủng như ATCC 14579 *B. cereus* và ATCC 64 *Brevibacillus laterosporus* sử dụng làm chủng kiểm soát dương và kiểm soát âm.

Thử nghiệm sinh acid: cấy khuẩn vào các ống có chứa môi trường lỏng glucose có chỉ thị pheno red. Ủ trong điều kiện kỵ khí ở 35°C/24 giờ trong bình kỵ khí GasPak. Lắc các ống và quan sát sự tăng trưởng qua độ đục và sự chuyển màu từ đỏ sang vàng, điều này chỉ thị thấy acid được sinh ra từ glucose trong điều kiện kỵ khí. Chuyển đổi màu một phần từ đỏ sang cam/vàng có thể xảy ra ngay cả trong thử nghiệm kiểm soát không

cấy khuẩn, là do pH giảm khi môi trường phơi ra trong điều kiện có CO_2 được hình thành trong bình kỵ khí GasPak.

Thử nghiệm khử nitrate: thử nghiệm này nhằm kiểm tra khả năng khử nitrate thành nitrite của vi khuẩn. Trong thử nghiệm này cấy khuẩn vào môi trường nitrate lỏng, ủ ở 35°C/ 24 giờ. Sau đó cho thuốc màu vàng sẽ xuất hiện trong 10 phút cho thấy nitrate đã được khử thành nitrite.

Bảng 35.5. Đặc điểm khác biệt của các loài *Bacillus*.

Đặc điểm	***B. cereus***	***B. thuringiensis***	***B. mycoides***	***B. weihenstephanensis***	***B. anthracis***	***B. megaterium***
Gram	+[a]	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Di động	+/–[b]	+/–	–[c]	+	–	+/–
Khử nitrate	+	+	+	+	+	–[d]
Phân hủy tyrosine	+	+	+/–	+	–[d]	+/–
Kháng lysozyme	+	+	+	+	+	–
Phản ứng với egg yolk	+	+	+	+	+	–
Sử dụng glucose trong điều kiện ky khí	+	+	+	+	+	–
VP	+	+	+	+	+	–
Acid từ mannitol	–	–	–	–	–	+
Tiêu huyết (RBC cừu)	+	+	+	ND	–[d]	–
Đặc điểm gây bệnh	Tạo độc tố đường ruột	Tinh thể nội độc tố gây bệnh cho con trùng	Tăng trưởng dạng rễ	Tăng trưởng ở 6°C; không tăng trưởng ở 43°C	Gây bệnh cho động vật và người	

[a] +, 90-100% các chủng cho kết quả dương; [b] +/–, 50-50% các chủng cho kết quả dương; [c] –, 90-100% các chủng cho kết quả âm; [d] –, hầu hết các chủng âm; ND: không xác định. Nguồn BAM, FDA.

Thử nghiệm VP: thử nghiệm này nhằm kiểm tra khả năng sản sinh acetylmethyl-carbinol. Theo đó cấy khuẩn vào môi trường VP cải tiến, ủ ở 35°C/ 48 ± 2 giờ. Sau đó cho 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml potassium hydroxide 40%/1ml dịch khuẩn, lắc và thêm một ít tinh thể creatine. Quan sát kết quả sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Thử nghiệm cho kết quả dương khi có màu hồng hoặc màu tím xuất hiện.

Thử nghiệm phân huỷ tyrosine: cấy khuẩn vào môi trường thạch nghiêng tyrosine. Ủ ở 35°C/ 48 giờ. Quan sát vùng trong của môi trường gần nơi vi khuẩn tăng trưởng để phát hiện tyrosine đã bị phân huỷ. Thử nghiệm được kết luận là âm khi thời gian ủ đủ 7 ngày.

Kiểm tra khả năng tăng trưởng trong môi trường có lysozyme: cấy khuẩn vào môi trường lỏng dinh dưỡng có 0,001% lysozyme. Ủ ở 35°C/24 giờ. Kiểm tra vi khuẩn tăng trưởng trong môi trường dinh dưỡng lỏng có lysozyme. Thử nghiệm cũng cần tiến hành trên kiểm soát âm và kiểm soát dương. Thử nghiệm kết luận âm khi được ủ thêm 24 giờ.

35.5.7. Đặc điểm định danh:

B. cereus biểu hiện các đặc điểm sau:

(1). Là trực khuẩn Gram dương có bào tử nhưng túi bào tử không phồng lên;

(2). Trên môi trường thạch MYPA tạo enzyme lecithinase và không lên men mannitol;

(3). Tăng trưởng và tạo acid trong điều kiện kỵ khí;

(4). Khử nitrate thành nitrite (một số chủng có thể cho kết quả âm);

(5). Có VP dương, sản sinh acetylmethylcarbinol;

(6). Phân huỷ L-tyrosine; và

(7). Tăng trưởng được trong môi trường có 0,001% lysozyme.

Các thành viên của nhóm *B. cereus* có những đặc điểm cơ bản này, bao gồm các chủng rhizoid của *B. mycoides, B. thuringiensis* tạo tinh thể độc tố gây bệnh cho côn trùng và *B. anthracis* gây bệnh cho động vật có vú. Tuy nhiên các loài có thể phân biệt với loài *B. cereus* bằng xác định các đặc điểm đặc trưng điển hình cho mỗi loài. Các thử nghiệm nhằm phân biệt các thành viên thuộc nhóm *B. cereus* (Bảng 35.5).