

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH  
KHOA NÔNG NGHIỆP – THỦY SẢN



**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG**

**TỈ LỆ NHIỄM VÀ SỰ NHẠY CẢM KHÁNG SINH CỦA VI  
KHUẨN *VIBRIO CHOLERAE* TRÊN HUYẾT HEO,  
NGHÊU VÀ TRÊN NGƯỜI TIÊU CHẢY  
TẠI TỈNH TRÀ VINH**

**CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI: Ths. NGUYỄN THỊ ĐÁU  
ĐƠN VỊ: BỘ MÔN CHĂN NUÔI THÚ Y**

*Trà Vinh, tháng      năm 2012*

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH  
KHOA NÔNG NGHIỆP – THỦY SẢN



**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG**

**TỈ LỆ NHIỄM VÀ SỰ NHẠY CẢM KHÁNG SINH CỦA VI  
KHUẨN *VIBRIO CHOLERA*E TRÊN HUYẾT HEO, NGHÊU VÀ  
TRÊN NGƯỜI TIÊU CHẢY  
TẠI TỈNH TRÀ VINH**

**Xác nhận của cơ quan chủ trì**  
*(ký tên và đóng dấu)*

**Chủ nhiệm đề tài**  
*(ký tên, họ tên)*

**Ths. Nguyễn Thị Đâu**

*Trà Vinh, ngày tháng năm 2012*

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của bản thân. Các số liệu, kết quả trình bày trong đề tài là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào trước đây.

**Tác giả**

**Nguyễn Thị Đâu**

## LỜI CẢM TẠ

Chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu, Ban lãnh đạo khoa Nông nghiệp – Thủy Sản trường Đại học Trà Vinh cùng các đồng nghiệp trong bộ môn Chăn Nuôi Thú y đã tạo điều kiện về vật chất, tinh thần trong suốt quá trình tôi tham gia đề tài.

Chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Chi cục Thú y tỉnh Trà Vinh đã tạo điều kiện cho chúng tôi tham gia lấy mẫu tại các cơ sở giết mổ trong địa bàn Tỉnh.

Chân thành cảm ơn các anh chị em Bộ môn Vi sinh Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng trường Đại học Cần Thơ, anh chị em Bộ môn Vi sinh trường Đại học Y Dược Cần Thơ, anh chị khoa xét nghiệm bệnh viện Đa khoa Trung ương Cần Thơ đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi hoàn thành nghiên cứu đề tài này.

Cảm ơn các em sinh viên Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng trường Đại học Cần Thơ, các em sinh viên lớp DA09BTY Khoa Nông nghiệp – Thủy sản trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ tôi trong thời gian qua.

**Nguyễn Thị Đấu**

## TÓM LƯỢC

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên 100 mẫu huyết heo tại các cơ sở giết mổ, trên nghêu 160 mẫu ở các huyện có nuôi nghêu phổ biến và trên người tiêu chảy 40 mẫu, lần lượt là: trên nghêu 10%, huyết heo có pha nước tại cơ sở giết mổ (có nồng độ muối từ 2-3%) 4%, chưa có dấu hiệu dương tính trên người tiêu chảy tại tỉnh Trà Vinh.

Nghiên cứu cũng đánh giá sự kháng kháng sinh của 20 chủng vi khuẩn *Vibrio cholerae* gây bệnh hiện diện trên các mẫu bệnh phẩm gồm 06 loại kháng sinh và xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp dùng đĩa giấy kháng sinh (Kirby-Bauer) và máy làm kháng sinh đồ tự động báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất, cho kết quả kháng sinh đảm bảo có độ chính xác cao bởi giá trị nồng độ ức chế tối thiểu riêng biệt cho 18 – 20 loại kháng sinh khác nhau.

Kết quả kháng sinh đồ cho thấy đa số vi khuẩn *Vibrio cholerae* nhạy với Norfloxacin (100%), với Chloramphenicol (70%), và đề kháng với hoàn toàn với Amoxicillin (90%).

Kết quả xác định giá trị MIC cho thấy vi khuẩn có với giá trị MIC đối với Norfloxacin là 0.25µg/ml, với Tetracycline < 1µg/ml, với Chloramphenicol < 2 1µg/ml

Kết quả của nghiên cứu cũng xác định các type huyết thanh gồm 15% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đa giá (O139, Ogawa, Inaba), 10% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và kháng huyết thanh đơn giá Inaba, phổ biến trên mẫu bệnh phẩm được phân lập ở các địa bàn nghiên cứu của đề tài trong tỉnh Trà Vinh.

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
<b>MỞ ĐẦU</b>	1
<b>Chương 1: TỔNG QUAN</b>	3
1.1. Lịch sử bệnh do vi khuẩn tả	3
1.2. Phân loại - Đặc điểm vi khuẩn của <i>Vibrio cholerae</i>	4
1.2.1. Phân loại vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i>	4
1.2.2. Đặc điểm hình dạng của <i>Vibrio cholerae</i>	5
1.2.3. Kháng nguyên	6
1.2.4. Độc tố	6
1.2.5. Sức đề kháng của <i>Vibrio cholerae</i>	8
1.2.6. Đặc điểm nuôi cấy và tăng trưởng của <i>Vibrio cholerae</i>	9
1.3. Truyền nhiễm học	9
1.3.1. Sinh thái <i>V.cholerae</i>	9
1.3.2. Đường xâm nhập	10
1.3.3. Cơ chế gây bệnh	12
1.3.4. Sinh bệnh học	12
1.3.5. Cách lây lan	13
1.3.6. Triệu chứng bệnh	14
1.3.7. Chẩn đoán	15
1.3.8. Phòng và trị bệnh	18
1.4. Ngộ độc thực phẩm do <i>Vibrio cholerae</i>	19
1.5. Nguyên nhân đề kháng kháng sinh của <i>Vibrio cholerae</i>	20
<b>Chương 2: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	21
2.1. Thời gian, địa điểm	21
2.2. Đối tượng nghiên cứu	21
2.3. Vật liệu nghiên cứu	21
2.4. Phương pháp nghiên cứu	22
2.5. Nội dung nghiên cứu	23
2.5.1. Xác định tỷ lệ phân lập của các chủng <i>Vibrio cholerae</i>	23

2.5.2. Xác định tính đề kháng kháng sinh của các chủng <i>Vibrio cholerae</i> bằng kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh và MIC.	31
2.5.3. Các chỉ tiêu theo dõi - Xử lý số liệu	34
<b>Chương 3: KẾT QUẢ THẢO LUẬN</b>	35
3.1 Đánh giá tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên các loại mẫu phân lập	35
3.1.1 Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên huyết heo có pha nước muối	36
3.1.2 Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên ghêu theo huyện	38
3.1.3 Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên trên huyết heo theo huyện	37
3.2 Kết quả tính nhạy cảm và đề kháng kháng sinh	40
3.2.1 Xác định bằng phương pháp dùng đĩa giấy kháng sinh	40
3.2.2 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)	43
3.3 Kết quả xác định type huyết thanh phổ biến gây bệnh tại Trà Vinh	44
<b>Chương 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</b>	46
4.1 Kết luận	46
4.2 Đề nghị	46
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	

## DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Cấu tạo vi khuẩn <i>V. cholerae</i> .	6
1.2	Trình tự di truyền của <i>V.cholerae</i>	7
1.3	Sự hình thành chủng <i>V.cholerae</i> có độc tố	7
1.4	Sự chuyển giao gen theo chiều ngang	8
1.5	Đường lây truyền của <i>V.cholerae</i>	12
1.6	Các phương thức truyền lây	14
2.1	Khuẩn lạc trên môi trường TCBS	25
2.2	Kết quả thử oxydase	26
2.3	Kết quả thử sinh hóa	26
2.4	Xác định type huyết thanh <i>V. cholerae</i>	28
2.5	Kết quả kháng sinh đồ	32
2.6	Huyền dịch vi khuẩn	33
2.7	Thẻ (card) kháng sinh đồ	33



## DANH SÁCH BẢNG

<b>Bảng</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
1.1	Phân biệt bệnh tả và tiêu chảy cấp	16
1.2	Tính chất sinh hóa giữa các nhóm	17
1.3	Phân biệt <i>V. cholerae</i> với <i>V. parahaemolyticus</i>	17
2.1	Tóm tắt thử nghiệm kháng huyết thanh <i>V. cholerae</i>	29
2.2	Tiêu chuẩn đánh giá sự nhạy cảm đối với kháng sinh	31
2.3	Kết quả nồng độ MIC của các kháng sinh	34
3.1	Tổng hợp tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên các loại mẫu	35
3.2	Tỉ lệ nhiễm <i>V. cholerae</i> trên huyết heo có pha nước muối	36
3.3	Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> ngẫu nhiên theo Huyện	37
3.4	Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> trên huyết heo theo Huyện	39
3.5	Tỉ lệ nhạy cảm và đề kháng kháng sinh <i>Vibrio cholerae</i>	40
3.6	Giá trị MIC đối với <i>Vibrio cholerae</i>	43
3.7	Tỉ lệ nhiễm <i>Vibrio cholerae</i> theo type huyết thanh	44

## DANH MỤC SƠ ĐỒ - BIỂU ĐỒ

<b>Sơ đồ</b>	<b>Tên sơ đồ</b>	<b>Trang</b>
2.1	Phân loại các type <i>V. cholerae</i>	5
2.1	Phân lập <i>Vibrio cholerae</i>	30
4.1	Sự nhạy cảm và đề kháng kháng sinh	48

## CHỮ VIẾT TẮT

---

TT	CHỮ VIẾT TẮT	CHỮ VIẾT ĐẦY ĐỦ
1	KN	Kháng nguyên
2	KHT	Kháng huyết thanh
3	TCP	Toxicogenic phage
4	CTXΦ	Gen mang độc tố
5	CT	Toxicogenic tả
6	Chr	Chromosome
7	CDC	Centers for Disease Control and Prevention
8	MIC	Minimum Inhibitory Concentration

---

## MỞ ĐẦU

Thời gian gần đây, Việt Nam xảy ra 3 đợt dịch tiêu chảy cấp nguy hiểm: Đợt thứ nhất từ ngày 23/10 - 6/12/2007 ở 14 tỉnh, thành phía Bắc với 1.878 ca, trong đó có 295 trường hợp dương tính với vi khuẩn tả; Đợt thứ hai từ ngày 24/12/2007 - 5/2/2008 ở Hà Nội với 58 ca, có 32 ca do vi khuẩn tả; Đợt thứ ba, từ ngày 6/3 đến 11/4, đã có 1.335 ca, trong đó 136 ca dương tính với vi khuẩn tả, ở 18 tỉnh, thành thuộc cả 3 miền Bắc - Trung - Nam. Năm 2009, dịch tả lại xuất hiện tại các tỉnh phía Bắc (Võ Văn Lượng, 8/2009).

Kết quả nghiên cứu của Cục Y tế dự phòng, viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cho thấy, vi khuẩn tả đang lưu hành ở Việt Nam từ năm 2007 đến nay có hiện tượng tăng độc lực, có khả năng gây bệnh lâm sàng mạnh hơn, tồn tại lâu hơn trong môi trường.

Theo đó, vi khuẩn tả gây bệnh được xác định là vi khuẩn *V.cholerae* nhóm O1, type huyết thanh Ogawa, type sinh học El tor biến đổi. Vi khuẩn này có cấu trúc gen của chủng El tor, nhưng lại mang gen độc lực của type cổ điển, khiến nó tăng độc lực với khả năng gây bệnh lâm sàng nặng hơn, có số người lành mang trùng và thời gian mang trùng nhiều và dài hơn, khả năng tồn tại lâu hơn trong môi trường [13].

Tính đến 19/8/2010 đã có 4 địa phương gồm: Bến Tre, Tiền Giang, thành phố Cần Thơ và An Giang xuất hiện bệnh nhân mắc bệnh tiêu chảy do vi khuẩn *V.cholerae* . Một số nước trong khu vực như Lào, Campuchia đã có nhiều trường hợp tử vong do bệnh tả, vi khuẩn tả gây bệnh ở Việt Nam giống với chủng vi khuẩn tả gây bệnh tại Lào và Thái Lan (*X.Thai, 2010*)

Tỉnh Trà Vinh với vị trí địa lý có nguy cơ tiềm ẩn bệnh dịch tả vì phía Bắc Trà Vinh giáp với Bến Tre, phía Nam giáp Sóc Trăng, phía Tây giáp Vĩnh Long, phía Đông giáp biển với chiều dài bờ biển 65 km, trên địa bàn Trà Vinh có hệ thống sông chính với tổng chiều dài 578 km, trong đó có các sông lớn là sông Hậu, sông Cổ Chiên và sông Măng Thít , vì thế rất dễ cho việc lưu hành vi khuẩn tả từ sông Cổ Chiên, biển Duyên Hải và Cầu Ngang ([http://vi.wikipedia.org/wiki/Tra\\_Vinh](http://vi.wikipedia.org/wiki/Tra_Vinh)).

Huyện Cầu Ngang và Duyên Hải của tỉnh Trà Vinh có ranh giới giáp với biển, đây là điều kiện để người dân nuôi trồng thủy sản, trong đó nguồn lợi quan trọng là nuôi nghêu và đánh bắt hải sản. Vì thế, thức ăn hải sản được xem là loại thức ăn đặc sản và được người dân sử dụng rất phổ biến.

Các nghiên cứu trong nước cho thấy triệu chứng chính của bệnh tả trên người là do độc tố của vi khuẩn *V. cholerae* gây ra. Vi khuẩn có mặt ở các môi trường nước biển và nguồn nước bị ô nhiễm, sự thay đổi về tính nhạy cảm kháng sinh của *V. cholerae* O1 ở Việt Nam cũng được ghi nhận trên một số loại kháng sinh [4].

Đặc biệt, tại vùng đồng bằng sông Cửu Long, từ trước đến nay chưa có nhiều nghiên cứu về vấn đề này. Với hy vọng góp phần xác định tỷ lệ phân lập và mức độ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio cholerae* để từ đó giúp cho cơ sở y tế có chiến lược sử dụng kháng sinh đúng nhằm làm giảm tỷ lệ tử vong, làm giảm chi phí trong điều trị bệnh, phù hợp với điều kiện kinh tế khu vực là cần thiết và cấp bách, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “Tỉ lệ nhiễm và sự nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trên huyết heo, nghêu và trên người tiêu chảy tại tỉnh Trà Vinh”.

#### **Mục tiêu đề tài**

- Xác định tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên mẫu phân lập
- Xác định tính nhạy cảm kháng sinh của các chủng *Vibrio cholerae* bằng kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh và MIC.
- Xác định type phổ biến có trên các loại mẫu có thể gây bệnh cho người.

#### **Đối tượng, phạm vi và nội dung nghiên cứu**

Đề tài nghiên cứu đối với vi khuẩn *Vibrio cholerae* trên các loại mẫu:

- Mẫu huyết heo tại các cơ sở giết mổ ở Thành phố Trà Vinh, huyện Châu Thành, huyện Duyên Hải, huyện Cầu Ngang và huyện Càng Long.
- Mẫu nghêu tại vùng nuôi nghêu ở huyện Duyên Hải, huyện Cầu Ngang
- Mẫu phân người tiêu chảy tại bệnh viện Đa khoa Trà Vinh.

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1 LỊCH SỬ BỆNH DO VI KHUẨN TẢ

Bệnh tả xuất hiện cách đây hàng thế kỷ tại lục địa Ấn độ trong các tư liệu của Hippocrates. Năm 1563, Garcia del Huerto (một bác sỹ người Bồ Đào Nha tại Goa, Ấn Độ) đã mô tả bệnh này. Năm 1849, John Snow (Bác sĩ người Anh) cho rằng nước là môi trường truyền bệnh. Năm 1883, Robert Koch (nhà vi sinh vật người Đức) phân lập thành công vi khuẩn từ phân của bệnh nhân biểu hiện các triệu chứng của bệnh này. Có tài liệu cho rằng trước đó 30 năm nhà giải phẫu học người Ý đã phát hiện ra vi khuẩn là nguyên nhân gây bệnh [15].

Tại Mỹ, dịch tả xuất hiện vào những năm 1800 sau đó được khống chế do đảm bảo vệ sinh nguồn nước sinh hoạt. Tuy vậy, giao thông và du lịch tạo điều kiện để bệnh xuất hiện lẻ tẻ, đa số trường hợp do đi du lịch tại các nước Mỹ La tinh, Châu Phi , Châu Á. Một số trường hợp nhiễm bệnh do ăn thức ăn mang về từ các quốc gia còn lưu hành bệnh. Vi khuẩn tả có mặt trong các vùng nước lợ, nước mặn ven biển. Một số người bị bệnh tại Mỹ do ăn sò hay ăn tái sò từ vịnh Mêxico [10].

Năm 1817 bệnh xuất hiện tại Châu Âu và Mỹ, đến đầu thế kỷ 20 đã có 6 “làn sóng bệnh tả” lan khắp thế giới. Tiếp đó, đến những năm 60 phạm vi “tung hoành” của vi khuẩn tả đã được “khoanh vùng” đến những năm gần đây chủ yếu bệnh xuất hiện ở Đông Nam Á. Năm 1961 type “El Tor” gây dịch tại Philippin và tạo “làn sóng thứ bảy”. Từ đó type vi khuẩn này tiếp tục gây những vụ dịch tại châu Á, vùng Trung Đông, Châu Phi và một phần Châu Âu [15].

Tháng 12 năm 1992 một vụ dịch lớn lại xảy ra ở Bangladesh, vi khuẩn gây bệnh được xác định là *V. cholerae* O139 “Bengal”. Về mặt di truyền, O139 “Bengal” hình thành từ El Tor nhưng cấu trúc kháng nguyên của chúng cũng biến đổi. Tất cả mọi lứa tuổi (kể cả trong vùng đã có dịch) đều có thể bị nhiễm. O139 đã gây bệnh tại ít nhất 11 nước ở Đông Nam Á đến năm 2005 [25].

Tháng 12/2007: Việc thiếu nước sạch tại Iraq đã dẫn đến một đợt bùng phát của bệnh dịch tả [32] Tính đến 02/12/2007, Liên Hiệp Quốc đã báo cáo 22 người chết và 4.569 trường hợp được phòng thí nghiệm xác nhận [40].

Tháng 04/ 2008 có 2490 người từ 20 tỉnh trên khắp Việt Nam đã nhập viện với bệnh tiêu chảy cấp. Trong số những người nhập viện, 377 bệnh nhân xét nghiệm dương tính với vi khuẩn tả *V. Cholerae* (Cholera Country Profile: Vietnam, WHO).

Tháng 10/2010 đến tháng 1/2012, Haiti và Cộng hòa Đô-mi-ni-ca, đã có 7.000 người chết vì bệnh dịch tả do *V. cholerae* bùng phát ở Haiti [35].

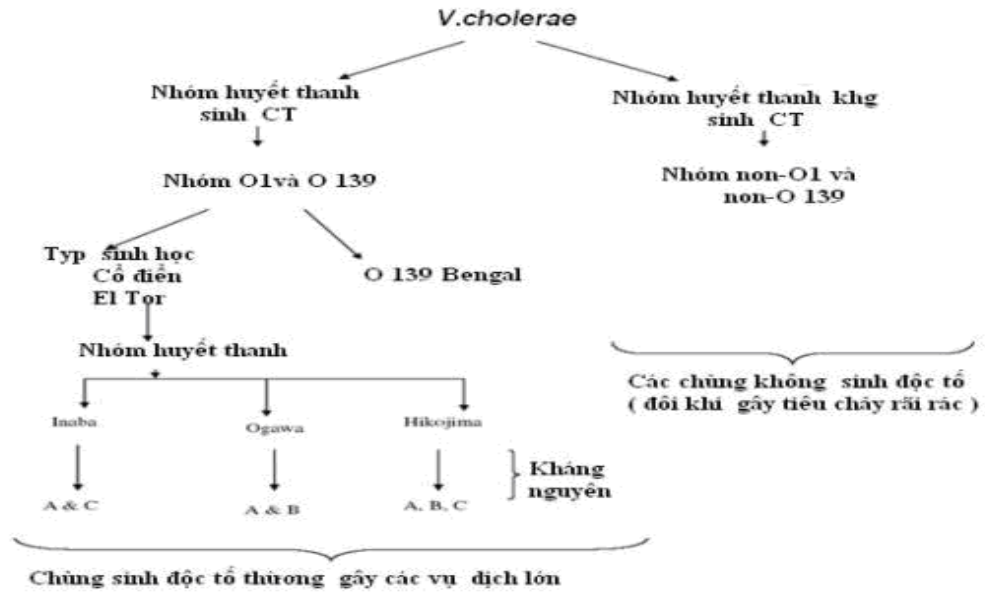
Dịch tả bùng phát trong năm 2011 và 2012 ở các nước châu Phi, trong tất cả các khu vực trừ Bắc Phi. Ở Sierra Leone, 21.500 trường hợp với 290 ca tử vong (allafrica, 2012)

## **1.2 PHÂN LOẠI - ĐẶC ĐIỂM VI KHUẨN *VIBRIO CHOLERA***

### ***1.2.1 Phân loại vi khuẩn *Vibrio cholerae****

*Vibrio cholerae*, là vi khuẩn Gram âm, được phân loại căn cứ trên kháng nguyên O ở phần thân và các type huyết thanh (serovars) hoặc nhóm huyết thanh (serogroup), đến nay người ta đã biết có ít nhất 200 serogroups [1].

Trước năm 1992, nhóm O1 là nhóm huyết thanh (serotype) duy nhất gây ra dịch. Các chủng thuộc nhóm huyết thanh O1 được chia ra làm 2 type sinh học (biotype), là type cổ điển và type El Tor dựa theo sự phân biệt các kiểu hình và gần đây bằng các dấu ấn (marker) di truyền. Có đến 7 đại dịch đã xảy ra, và có bằng chứng chắc chắn là ít nhất đại dịch thứ 5 và thứ 6 là do các chủng thuộc nhóm O1 cổ điển. Đại dịch thứ 7 hiện nay là do biotyp El Tor. Năm 1992, một nhóm huyết thanh khác, là O139 gây ra các vụ bùng phát tại Ấn độ và Bangladesh (Ramamurthy et al 1993). Hiện thời, 2 nhóm huyết thanh này là nguyên nhân gây bệnh tả lưu hành và phát thành dịch; còn những nhóm huyết thanh *V. cholerae* khác không gây dịch hoặc đại dịch được gộp chung lại thành nhóm *V. cholerae non-O1*, non-O139.



**Sơ đồ 2.1: phân loại các type *V. cholerae*;** (Nguồn: <http://vietsciences.free.fr> )

Việc phân loại nhóm huyết thanh được thực hiện bằng cách cho kháng huyết thanh (antisera) hấp phụ hoặc cho các kháng thể đơn dòng hấp phụ thành phần kháng nguyên “O” của lớp lipopolysaccharide trên màng tế bào vi khuẩn.

Ngoài ra, *V. cholerae* O1 còn được phân ra thành 3 type huyết thanh, Ogawa, Inaba và Hikojima; type thứ 3 này ít gặp và cũng chưa được mô tả đầy đủ. Các type huyết thanh này được chia thành 3 loại kháng nguyên (KN): A, B và C. KN A cấu tạo từ 3- deoxy-L-glycerotetronic acid, còn KN B và C chưa rõ. Chủng O139 Bengal và những chủng gây bộc phát thuộc serogroup O1 của cả 2 type sinh học là cổ điển và El Tor có nhiều điểm tương đồng, nhưng cũng có nhiều điểm khác biệt đáng kể. Chủng O139 có vỏ bọc, đó là điểm khác với các chủng O1 và còn nhiều điểm khác biệt trong thành phần KN “O” ở phần lipopolysaccharide ở màng tế bào vi khuẩn [1].

### 1.2.2 Đặc điểm hình dạng của *Vibrio cholerae*

Vi khuẩn tả có chiều dài từ 1µm đến 3 µm và chiều ngang từ 0,5 µm cho đến 0,8 µm (1mm = 1.000 µm). Chúng có 1 sợi lông dài (flagellum) ở một đầu giúp chúng di chuyển rất nhanh theo hình xoắn ốc loạng choạng. Quan sát dưới kính hiển vi, nhiều người dùng danh từ “sao xẹt” để mô tả sự di chuyển nhanh chóng của chúng.

### 1.2.3 Kháng nguyên

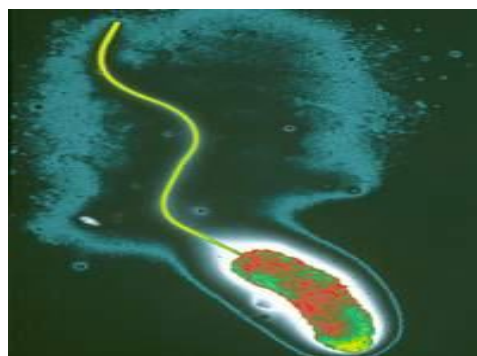
Vi khuẩn tả có 2 loại kháng nguyên chính: kháng nguyên H (từ cái đuôi: flagellar H antigen) và kháng nguyên O từ thân vi khuẩn (somatic O antigen). Người ta dùng hệ thống của Sakasaki và Shimada dựa vào kháng nguyên O để phân loại. Vì loại O1 gây hầu hết các trận dịch và đại dịch, nên người ta phân ra 2 nhóm: O1 và không phải O1 (non-O1). Theo sự phản ứng của huyết thanh mà người ta tìm thấy 206 nhóm O và đánh theo số thứ tự: O1, O2, O3,... O206 nhưng chỉ có nhóm vi khuẩn tả O1 và O139 có thể gây thể bệnh lý tả và có thể gây ra đại dịch [1], [7].

Vi khuẩn tả *Vibrio cholerae* nhóm O1 cổ điển và El tor chia ra làm 3 nhóm phụ căn cứ vào kháng nguyên của thân vi khuẩn (somatic O antigen) và đặc tính di truyền (type sinh học):

- Nhóm phụ Ogawa: mang somatic O antigen và đặc tính di truyền A và C.
- Nhóm phụ Inaba: mang somatic O antigen và đặc tính di truyền A và B.
- Nhóm phụ trung gian, không bền, giữa 2 nhóm Inaba và Ogawa. Nó được gọi là Hikojima: mang somatic O antigen và đặc tính di truyền A, B, và C.

### Hình 1.1 Cấu tạo vi khuẩn *V. cholerae*

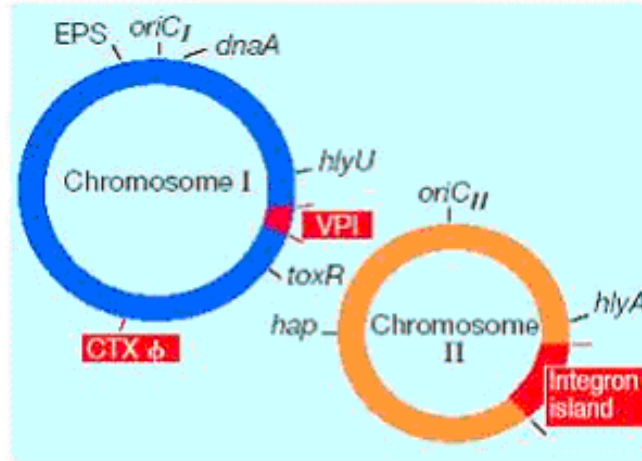
( <http://www.moh.gov.vn/homebyt/vn/portal> )



### 1.2.4 Độc tố

Có 2 trình tự quan trọng trong quá trình tiến hóa của *V. cholerae* gây bệnh lý. Trước hết, các chủng *V. cholerae* tiếp nhận phage TCP và biến thành *V. cholerae* TCP+. Sau khi trở thành TCP+, tức là vi khuẩn có tua, tua sẽ đóng vai trò thụ thể cho phage CTX $\Phi$  để cho phage chui vào vi khuẩn, và gắn DNA của nó vào chromosome của *V. cholerae* theo cơ chế phage tiềm tan (lysogenic).

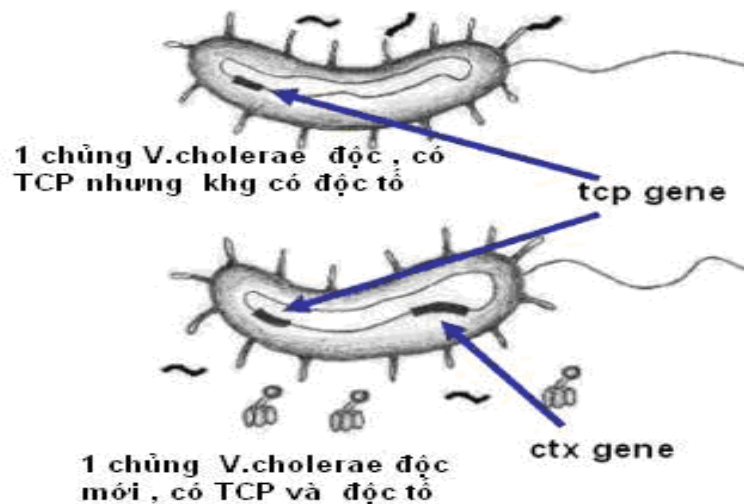




**Hình 1.2. Trình tự di truyền *V. cholerae***

(Nguồn: <http://vietsciences.free>)

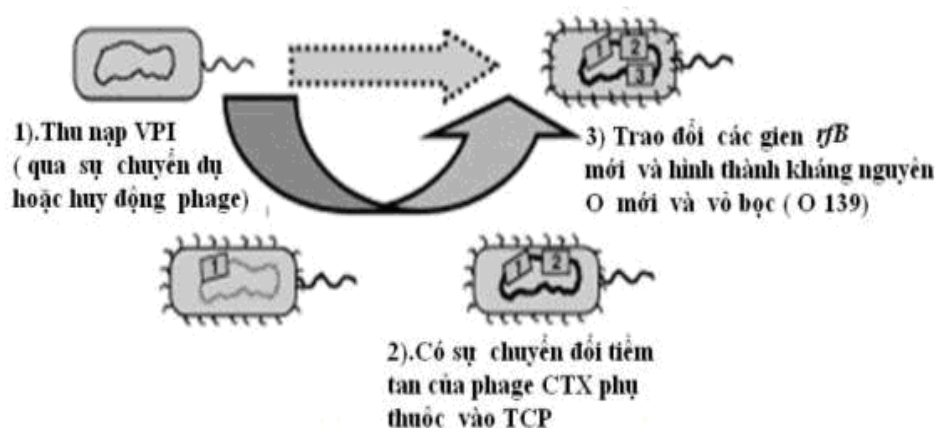
Bản chất của các gene CTX và TCP đều là bacteriophage từ bên ngoài được gắn vào trong chromosome của *V. cholerae*. Có người cho rằng *V. cholerae* vốn là 1 vi khuẩn “hiền” nhưng khi bị các bacteriophage gây nhiễm chúng mới trở thành chủng sinh độc tố và gây bệnh lý *V. cholerae* trở thành chủng sinh độc tố (toxicogenic *V. cholerae*) và gây bệnh khi nào chúng có tiêm mao giúp vi khuẩn bám vào niêm mạc ruột non.



**Hình 1.3. Sự hình thành chủng *V.cholerae* có độc tố**

( Nguồn: <http://vietsciences.org>)

Giữa các bacteriophage CTX và TCP có một sự cộng tác như sau: phage CTX  $\Phi$  chui vào tế bào *V. cholerae* thông qua các tua (pili) vốn do 1 phage khác là TCP  $\Phi$  mã hóa. Khi DNA của CTX  $\Phi$  gắn vào chromosome thành 1 gene, gene này chịu sự kiểm soát của 1 gene khác là ToxR, vốn là gene cũng mã hóa gene TCP, để sản xuất ra độc tố CT [18].



**Hình 1.4. Sự chuyển giao gen theo chiều ngang**

(Nguồn: [www.fems.microbiology.org](http://www.fems.microbiology.org))

Cơ chế sinh độc tố này nằm trong bí mật về trình tự di truyền của *V. cholerae* mới được giải mã vào năm 2000 khi người ta phát hiện vi khuẩn này có 2 chromosome, 1 lớn (chr 1) và 1 bé (chr 2). Đây là điều thú vị bởi vì các vi khuẩn khác đều chỉ có 1 chromosome. 2 chromosome của *V. cholerae* đóng vai trò chuyển hóa và sao chép, tạo ra lợi thế tiến hóa cho vi khuẩn trong môi trường khi khí hậu thay đổi. Chromosome lớn (chr 1) chứa hầu hết những gene cần thiết cho sự tăng trưởng và sinh bệnh giúp cho vi khuẩn thích ứng và phát triển với môi trường ở ruột, chr 2 phụ trách chu trình biến dưỡng và điều hòa cần thiết để vi khuẩn sống trong các ổ ngoài môi trường [13], [27].

#### **1.2.5. Sức đề kháng của *Vibrio cholerae***

Trong nước và thức ăn, nhất là ở nhiệt độ lạnh, vi khuẩn có thể sống được từ vài ngày đến 2-3 tuần. Vi khuẩn tả có thể tồn tại nhiều năm trong các động vật thân mềm ở vùng ven biển. Nhưng vi khuẩn tả dễ bị diệt ở nhiệt độ 80<sup>0</sup> C trong 5 phút, bởi hóa chất cloramin B 10% và môi trường axit [22].

Vi khuẩn tả gây bệnh do tiết ra nội độc tố có độc tính cao đối với cơ thể người. Các nghiên cứu mới đây cho thấy vi khuẩn tả sản xuất ra men mucinase và neuraminidase có tác dụng làm giảm sự bảo vệ của chất nhầy ruột, đồng thời gây tổn thương màng tế bào niêm mạc ruột. Vi khuẩn tả có thể đột biến từ chủng không gây dịch thành chủng gây dịch và kháng thuốc với nhiều loại kháng sinh (Võ Văn Lượng, 8/2009).

#### **1.2.6. Đặc điểm nuôi cấy và tăng trưởng của *Vibrio cholerae***

*V. cholerae* là những trực khuẩn ngắn, mảnh, kích thước khoảng 0,3 x 3µm. Mới phân lập từ bệnh phẩm, vi khuẩn hình cong như dấu phẩy, đặc biệt di động rất nhanh, qua cấy truyền, hình dạng trở nên thẳng hơn.

Vi khuẩn tả mọc được dễ dàng trong môi trường nuôi cấy bình thường ở phòng thí nghiệm, không đòi hỏi yếu tố tăng trưởng đặc biệt, nhưng 5 -15mmol/l NaCl kích thích mọc tốt hơn. Ưa môi trường kiềm pH 8 - 9,5, sống ở nhiệt độ 16 – 42°C, nhiệt độ tối ưu 37°C, thuộc loại kỵ khí tùy nghi.

*V. cholerae* chết nhanh trong môi trường acid, dễ bị diệt bởi các chất tẩy uế, đặc biệt nhạy cảm với sự khô, chỉ tồn tại 10 phút ở 55°C. Tuy nhiên có thể sống được 4-7 ngày trên rau trái tươi để ở nơi mát và ẩm [1].

### **1.3. TRUYỀN NHIỄM HỌC**

#### **1.3.1. Sinh thái *V. cholerae***

Mặc dù *V. cholerae* là 1 thành phần của khuẩn chí bình thường vùng cửa sông, nhưng các chủng sinh độc tố chủ yếu chỉ phân lập được tại những môi trường chắc chắn bị vấy nhiễm bởi nguồn phẩy khuẩn từ người nhiễm thải ra. Các phân lập từ môi trường lấy ở các khu vực cách xa vùng có người nhiễm thường không chứa gen độc tố.

Các thí nghiệm trên mô hình động vật cho thấy rằng môi trường ruột là nơi mà các chủng *V. cholerae* có thể tiếp nhận các yếu tố di động (TCP) hiệu quả nhất. Vì thế, có thể hình dung *V. cholerae* như là 1 vi khuẩn cố hữu ở môi trường nước mặn, chúng chỉ định khu và tăng sinh một thời gian ngắn trong ruột người khi gây nhiễm cho người, rồi sau đó quay về cái ổ “cố hữu” của nó, đó là vùng cửa sông, trong thời gian giữa 2 vụ dịch [23].

Tuy *V. cholerae* nằm trong nhóm các vi sinh vật thuộc hệ sinh thái là môi trường nước, nhưng trong môi trường bên ngoài, các chủng O1 và O139 được phân lập ít so với các chủng non-O1 và non – O139. Hơn thế nữa, nằm ngoài vùng dịch và cách xa vùng bị bệnh tả gây vấy nhiễm, các phân lập ngoài môi trường của *V.cholerae* O1 thường không mang độc tố CT [25].

Có bằng chứng cho thấy *V.cholerae* O1 El Tor chuyển thành chủng O139 khi thu nạp 1 DNA mới, DNA này được gắn vào rồi thay thế cho cụm gene O ở chủng thu nhận. Trong phòng thí nghiệm, đã chứng minh được sự chuyển đổi giữa chủng *V. cholerae* O1 thành non-O1 và ngược lại. Sự hiện diện cùng 1 lúc của các chủng *Vibrio cholerae* O1 và O139 Bengal trên các phù phiêu sinh vật đã được chứng minh tại Bangladesh. Các bằng chứng gần đây cho thấy các phân lập O139 có thể phát sinh do sự trao đổi di truyền với những chủng *V. cholerae* non- O1 và những chủng lâm sàng O1[34].

Khi người nhiễm *V. cholerae* tiêu chảy ồ ạt, *V. cholerae* sinh độc tố được thải ra ngoài, nếu vấy nhiễm vào môi trường nước sẽ làm cho nồng độ chủng trong môi trường nước tăng lên và nếu nguồn nước này được sử dụng, sự vấy nhiễm qua nước uống và thực phẩm tăng lên, sau đó có thể là nguyên nhân dẫn tới các vụ bùng phát dịch tả. Trong khi sự chuyển đổi các chủng *V.choleare* không sinh độc tố xảy ra thuận lợi trong đường ruột của ký chủ loài có vú, thì sự chọn lọc tự nhiên và tồn tại của các chủng sinh độc tố mới có thể cần đến cả 2 yếu tố đường ruột và môi trường, tình trạng miễn dịch của quần thể ký chủ và đặc trưng kháng nguyên của chủng gây bệnh mới. Sự dẫn dụ các phage CTXΦ lysogens có lẽ chịu sự kiểm soát của các tín hiệu chính xác từ môi trường chẳng hạn như nhiệt độ tối ưu, ánh sáng mặt trời và các điều kiện về thẩm thấu và điều này cũng giải thích vì sao có những vụ bộc phát dịch theo mùa tại vùng có bệnh tả lưu hành [34].

### **1.3.2. Đường xâm nhập**

Nguồn lây bệnh là người bệnh và người lành mang mầm bệnh nhưng chưa có triệu chứng bệnh.

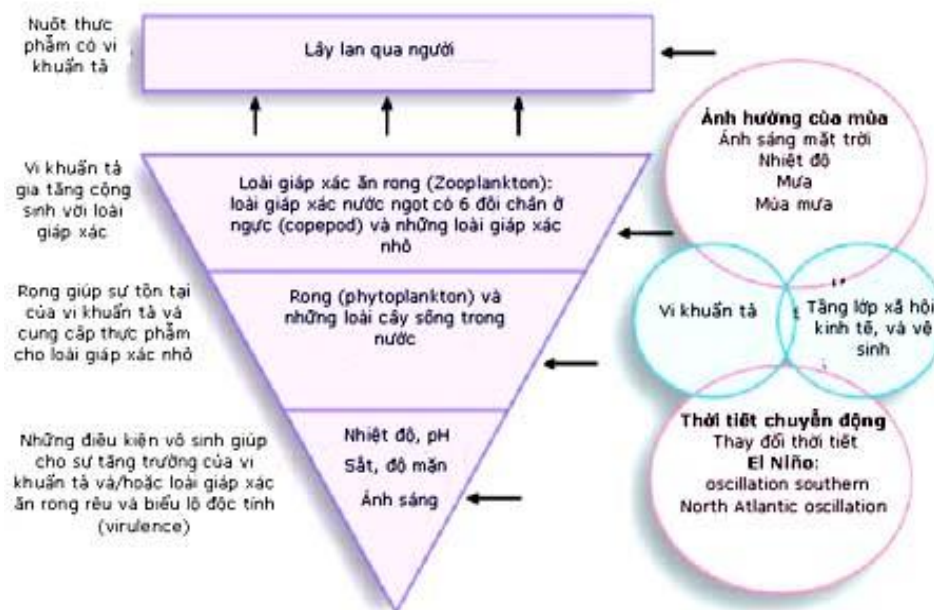
Bệnh tả lây qua đường tiêu hóa do ăn uống phải thức ăn bị nhiễm vi khuẩn tả. Nước, thực phẩm (lòng heo, tiết heo, thịt chó, nghêu, sò hến, tôm,...), rau quả, bàn tay, dụng cụ ăn uống, ruồi nhặng, chuột, gián... nhiễm khuẩn đều có thể làm lây lan bệnh. Bệnh tả thường lây lan nhanh theo cùng bếp ăn, theo nguồn nước bị ô nhiễm [14].

Số lượng vi khuẩn có trong phân xác định bệnh nặng, nhẹ hay chỉ là người lành mang mầm bệnh:

- Nếu có  $10^3$ - $10^5$  vi khuẩn/1g phân: người lành mang mầm bệnh.
- Nếu có  $10^6$  - $10^9$  vi khuẩn/1g phân: biểu hiện bệnh nhẹ.
- Nếu có  $10^{10}$  - $10^{12}$  vi khuẩn/1g phân: biểu hiện bệnh nặng.

Sau khi thải ra ngoài, vi khuẩn tả có thể tồn tại lâu ngày trong nước sông rạch (1-2 ngày), nước giếng (1-2 tuần), thức ăn ô nhiễm & thức ăn bảo quản lạnh, nhất là sữa (có thể đến 20 ngày). Đây chính là nguồn lây nhiễm chủ yếu từ người bệnh sang người lành khi ăn, uống phải thức ăn, nước uống bị nhiễm khuẩn. Ngoài ra, bệnh cũng có thể lây trực tiếp từ người bệnh sang nhân viên y tế hoặc người làm nghề tẩm liệm tử thi (bị nhiễm bệnh trước đó) [15].

Bệnh thường thấy ở những khu dân cư có mức sinh hoạt thấp, ô nhiễm môi trường nặng, ý thức giữ gìn vệ sinh chưa cao. Ruồi nhặng, rác ứ đọng, nước tù, gián, thực phẩm ôi thiu, ... là những tác nhân làm bùng phát bệnh.



**Hình 1.5. Đường lây truyền của *V.cholerae* (bệnh tả)**

(Nguồn: <http://www.ninh-hoa.com/dacsan-2008/DS2008>)

### 1.3.3. Cơ chế gây bệnh

- Độc tố của phẩy khuẩn tiếp xúc với bề mặt màng tế bào.
- Các thành phần liên kết (B) gắn với oligosaccharide của GM<sub>1</sub> ganglioside.
- Thay đổi dạng của thụ quan, cấu phần A tiếp xúc với màng tế bào.
- Cấu phần A xâm nhập vào tế bào.
- Liên kết disulfide của cấu phần A chịu tác động của glutathione trong tế bào dẫn đến giải phóng tiểu phần A<sub>1</sub> và A<sub>2</sub>.
- A<sub>1</sub> thủy phân NAD giải phóng ADP-Ribose và nicotinamide.
- Một trong các protein G của adenylate cyclase chịu tác động của ADPR sẽ ức chế hoạt động của GTPase và giữ adenylate cyclase ở trạng thái hoạt động.
- Adenylate cyclase xúc tác quá trình hình thành cAMP [2].

### 1.3.4. Sinh bệnh học

Bệnh tả phổ biến xuất hiện ở người do *V. cholerae* O1 gây ra, vi khuẩn vào cơ thể qua đường miệng gây bệnh với điều kiện:

- Vi khuẩn thoát qua được hàng rào acid của dịch vị, ở người bình thường, số lượng vi khuẩn nuốt vào phải nhiều, khoảng  $10^{10}$  vi khuẩn. Ở bệnh nhân thiếu toan dịch vị, người đã bị cắt dạ dày người dùng thuốc kháng sinh toan, số lượng  $10^2$  vi khuẩn nuốt vào đủ gây bệnh.

- Vi khuẩn phải có khả năng kết dính vào màng nhày biểu mô ruột, như thế nó phải di động nhanh để có thể xâm nhập lớp nhày bảo vệ bề mặt niêm mạc ruột. Khả năng di động, hoá hướng động, và tiết mucinase giúp vi khuẩn định cư, nhưng cơ chế kết dính vẫn chưa được rõ. Vi khuẩn có thể định cư suốt dọc lòng ruột, từ hồng tràng cho đến đại tràng và nhân lên.

- Vi khuẩn phải tiết 1 độc tố ruột hoàn chỉnh.

Hiệu quả sinh lý do tác động nội bào của độc tố có mức độ tùy thuộc sự cân bằng giữa số lượng vi khuẩn, sự sản xuất độc tố ruột, sự tiết dịch và sự hấp thu dịch trong ống tiêu hoá. Một cách tổng quát, môi trường kiềm lý tưởng cho sự tăng trưởng tiếp tục của vi khuẩn được hình thành, và dịch mất đi dưới dạng lượng lớn qua phân. Dịch và chất điện giải đổ vào lòng ruột nhiều nhất ở ruột non, nơi mà khả năng tiết ra cao hơn khả năng hấp thu nhiều. Trong lượng nước mất đi, nồng độ sodium bằng trong huyết tương, còn nồng độ potassium và bicarbonate gấp 2-5 lần. Hậu quả là bệnh nhân kiệt nước (mất nước đẳng trương), hạ kali máu (mất K), và biến dưỡng toan (mất bicarbonate) [1].

### ***1.3.5. Cách lây lan***

#### ***Các phương thức truyền lây***

##### **Gián tiếp**

- Nguồn nước bị nhiễm vi khuẩn: nguồn nước bị nhiễm vi khuẩn đóng một vai trò chủ yếu trong các vụ dịch. Khi dịch đã xảy ra, thì chính nhờ vào nguồn nước mà dịch lan ra nhanh chóng và phát triển thành đỉnh cao ngay vào tuần lễ thứ 2. Nếu xử lý tốt nguồn nước, dịch chỉ kéo dài khoảng 10 - 20 ngày.

- Thức ăn: cũng đóng một vai trò đáng kể như rau sống, bón phân tươi trong vụ dịch không xử lý kỹ, tôm, sò, hến, mắm ruốc, ...

**Trực tiếp:** Ít gặp, chỉ xảy ra ở nhân viên y tế, người nuôi bệnh hoặc nhân viên khám, liệm tử thi.

## ***Các yếu tố nguy cơ***

### **Vùng**

Bệnh xuất hiện ở vùng dân cư đông đúc, điều kiện vệ sinh kém, nước khan hiếm. Người có ít dịch vị như cắt dạ dày, teo niêm mạc dạ dày, hoặc pH dịch vị cao. Tại vùng dịch lưu hành, trẻ em dễ mắc bệnh hơn người lớn, vì người lớn được miễn dịch mắc phải trước đó, còn trong vùng chưa có dịch, khả năng nhiễm bệnh của mọi người và mọi giới như nhau. Người có nhóm máu O có nguy cơ mắc bệnh cao hơn.



**Hình 1.6. Các phương thức truyền lây**

(Nguồn: <http://360.carehub.vn/suc-khoe-a-z/benh-a-z/13011>)

### **Mùa**

Ở nước ta dịch xảy ra vào mùa khô nắng từ tháng 5 đến tháng 8 khi nước ao hồ cạn kiệt, nước sông bị nhiễm mặn, nhưng cũng có khi tản phát vào mùa đông. Dịch có xu hướng xảy ra 4 năm một lần. Tỷ lệ tử vong cao ở người già và trẻ con nhất là trẻ bị giun sán và suy dinh dưỡng.

#### ***1.3.6. Triệu chứng bệnh***

Cũng như tất cả các loại nhiễm khuẩn khác, nhiễm tả bắt đầu bằng thời kỳ nung bệnh rồi tăng dần đến giai đoạn toàn phát.

\* Thời kỳ nung bệnh: bắt đầu từ giờ thứ 4 kéo dài đến 4-5 ngày sau khi bị nhiễm khuẩn tả, trung bình vào khoảng 36-48 giờ. Do đó, bệnh nhân cần được cách ly trong vòng 5 ngày.



\* Thời kỳ khởi phát: Vào ngày hôm sau khi bị nhiễm (từ giờ thứ 24-48), bệnh khởi phát đột ngột với các triệu chứng như đau bụng (ít), tiêu chảy lúc đầu có phân nhưng sau đó toàn là nước, sôi ruột có thể xảy ra sau đó.

\* Thời kỳ toàn phát biểu hiện với 4 triệu chứng tiêu biểu:

Tiêu chảy xối xả hàng chục lần trong ngày, mỗi lần tiêu chảy cả lít nước. Do vậy, trong vòng từ 6-8 tiếng trong giai đoạn toàn phát, bệnh nhân có thể bị mất đến 20 lít nước. Phân của bệnh tả được mô tả là rất đặc hiệu với màu trắng đục như nước vo gạo, không có thức ăn, không có đờm máu, không hôi thối nhưng có mùi tanh nồng đặc biệt. Tiêu chảy lúc này dường như không kèm theo triệu chứng đau bụng & không mót rặn hay có cảm giác buồn cầu nên nhiều khi bệnh nhân đại tiện khi chưa kịp vào nhà xí.

Ói mửa thường xuất hiện sau tiêu chảy, lúc đầu ói ra thức ăn nhưng sau đó thì ói ra toàn dịch vàng (dân gian gọi là ói ra mật xanh mật vàng), hoặc có cảm giác buồn nôn kèm theo mỗi đi tiêu chảy.

Hậu quả của tiêu chảy & ói mửa là tình trạng cơ thể bị mất nước với các triệu chứng như da co dúm, nhăn nheo, mất tính đàn hồi của da khi véo vào, mắt trũng sâu, lò đờ, môi khô, ít hoặc không đi tiêu, có thể có chuột rút & các biểu hiện co giật như phong đòn gánh.

### **1.3.7. Chẩn đoán**

#### ***Chẩn đoán phân biệt dựa theo triệu chứng***

##### **Bệnh tả**

Bệnh tả (tiếng Anh là cholerae) được định nghĩa là một bệnh truyền nhiễm cấp tính ở ruột non và lây lan qua nước hay thức ăn bị nhiễm vi khuẩn. Vi khuẩn gây bệnh tả là *Vibrio cholerae*. Triệu chứng của bệnh tả là bệnh nhân bị tiêu chảy cấp tính, đau bụng, ói mửa và mất chất điện giải (electrolytes).

Khoảng 75% - 90% người bị nhiễm vi khuẩn *V. cholerae* nhưng không biểu hiện triệu chứng nào. Nhưng vi khuẩn trong người của những bệnh nhân không có triệu chứng này có thể lan truyền vào môi trường qua phân và có thể lan truyền đến người khác cũng như môi trường sống. Bệnh tả là một bệnh đáng sợ, vì nó có thể tấn công trẻ em cũng như người lớn và không giống như các

bệnh tiêu chảy khác, bệnh tả có thể gây tử vong cho bệnh nhân trong vòng vài ngày, thậm chí vài giờ sau khi mắc bệnh. Những người có khả năng miễn dịch thấp như trẻ em suy dinh dưỡng hay người nhiễm HIV thường có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn *V. cholerae*.

### Tiêu chảy cấp tính

Bệnh tiêu chảy cấp tính (tiếng Anh là acute diarrhoea), theo định nghĩa mà giới y khoa thế giới thừa nhận, khi bệnh nhân đi tiêu chảy hơn 3 lần trong một ngày thì được xem là một ca “tiêu chảy cấp tính”. Ngoài đi tiêu chảy ra nước, triệu chứng của tiêu chảy cấp tính thường là đau bụng, ói mửa và đau hậu môn. Khi tiêu chảy mà trong phân có máu, thì bệnh danh có khi gọi là kiết lỵ *shigella*. Bảng 1.1 sau đây sẽ phân biệt bệnh tả và tiêu chảy cấp tính.

Tiêu chảy có nhiều nguyên nhân, tiêu chảy nhẹ có thể do thay đổi thức ăn hay thói quen ăn uống, thời tiết thay đổi, lo lắng, tâm thần căng thẳng (stress), uống nhiều rượu bia, sử dụng thuốc (như thuốc trị sinh), v.v... Tiêu chảy cấp tính có thể do ngộ độc thực phẩm và nhiễm vi khuẩn, các vi khuẩn chính có thể gây tiêu chảy cấp tính bao gồm: *Calici*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *E. coli*, *Campylobacter*, *V. cholerae*, *Shigella*, *Salmonella* *Staphylococcus aureus*. Một số ký sinh vật như *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* và sán dây cũng có thể gây tiêu chảy cấp tính.

**Bảng 1.1. Phân biệt bệnh tả và tiêu chảy cấp**

Triệu chứng	Bệnh tả	Tiêu chảy	Kiết lỵ <i>Shigella</i>
<b>Đi tiêu</b>	- Trên 3 lần/ngày - Như nước vo gạo	- Trên 3 lần/ngày - Không có máu trong phân.	- Trên 3 lần/ngày - Có máu trong phân
<b>Sốt</b>	Không sốt	Lên cơn sốt	Lên cơn sốt
<b>Đau bụng</b>	Có	Có	Có
<b>Ói mửa</b>	Có	Có	Có
<b>Vi khuẩn “thủ phạm”</b>	Nhiễm vi khuẩn <i>V.cholerae</i>	Nhiều vi khuẩn <i>E.coli; Shigella; V.cholerae</i>	Nhiễm vi khuẩn <i>Shigella</i>

(Nguồn: <http://tieu-chay-cap-tinh-va-benh-ta-dinh-danh>, Nguyễn Văn Tuấn, 2010)

### **Chẩn đoán phân biệt dựa theo đặc tính sinh hóa**

Phân biệt với các phẩy khuẩn khác thuộc nhóm N.A.G

(Non Agglutinable Vibrios - các phẩy khuẩn không ngưng kết). Heiberg chia phẩy khuẩn thành 6 nhóm:

**Bảng 1.2: Tính chất sinh hóa giữa các nhóm**

Nhóm	Mannoza	Sacaroza	Arabinoza
I	+	+	-
II	-	+	-
III	+	+	+
IV	-	+	+
V	+	-	-
VI	-	-	-

Vi khuẩn tả thuộc nhóm I, từ nhóm II đến nhóm VI thuộc các phẩy khuẩn nhóm N.A.G, phân biệt với *V. parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* gây ngộ độc thức ăn do ăn hải sản với các triệu chứng viêm ruột và tiêu chảy cấp tính.

**Bảng 1.3: Phân biệt *V. cholerae* với *V. parahaemolyticus***

Đặc tính	<i>V. cholerae</i>	N.A.G	<i>V. parahaemolyticus</i>
Sacaroza	+	+	-
Arabinoza	-	-	+/-
Manoza	+	+/-	+
0%NaCl	+	+	-
3%NaCl	+	+	+
10%NaCl	-	-	-

(Nguồn: Viện VSDTTU, 2010)

### ***Chẩn đoán cận lâm sàng***

Phương pháp phân lập (nuôi cấy và phản ứng sinh hóa).

- Phương pháp miễn dịch:

+ Huyết thanh học.

+ ELISA.

+ Miễn dịch huỳnh quang.

- Phương pháp phân tử:

+ PCR ( Polymerase Chain Reaction).

+ Multiplex PCR.

+ Real- time PCR.

### ***1.3.8. Phòng và trị bệnh***

#### ***Phòng ngừa***

- Chỉ uống nước đã được nấu chín, tránh uống các các loại nước giải khát bán trên thị trường chưa được kiểm tra xuất xứ và vệ sinh.

- Chỉ ăn thức ăn đã được nấu chín và tốt nhất là ăn nóng.

- Tránh ăn các loại rau sống trong vùng đang có dịch hoặc nghi có dịch.

- Các nước phát triển khuyến cáo công dân của họ không dùng “đồ ăn uống vỉa hè” trong thời gian nghi ngờ có dịch hay đang có dịch tại các nơi họ đến du lịch hay làm việc và hạn chế “mang đồ ăn về làm quà tặng”.

- Vaccin phòng bệnh đã được sản xuất nhưng cũng có tác dụng phụ.

- Người bị nhiễm hay bị bệnh phải chú ý tránh để vi khuẩn “vương vãi” ra môi trường nhất là khu vực gần nguồn nước, khu vực trồng rau, v.v. ...

- Khu nấu đồ ăn và dụng cụ nấu phải đảm bảo vệ sinh.

- Rửa tay sạch trước khi chế biến đồ ăn và trước khi ăn.

- Các “bếp ăn tập thể” của trường học và cơ quan sản xuất càng phải chú trọng đến vệ sinh.

- Khi dịch đã xuất hiện, vệ sinh ăn uống là quan trọng nhất. Thực hiện “ăn chín”, “uống sôi” rất hữu ích đúng trong trường hợp bệnh này.

- Trong và sau khi điều trị tại các cơ sở y tế, bệnh nhân phải được qua các xét nghiệm bắt buộc (đặc biệt là xác định vi khuẩn trong phân) để khi xuất viện không còn trở thành nguồn mang bệnh [33].

### **Vaccin phòng bệnh do *Vibrio cholerae***

Cách phòng bệnh bằng vaccine đã làm thay đổi nhiều loại dịch bệnh trên toàn cầu nhiều năm qua và việc tìm ra nhiều loại vaccine mới vẫn đang là thách thức của y học. Tại Việt Nam, sự ra đời của vaccine tả công thức mới với hiệu lực bảo vệ cao và được các chuyên gia quốc tế đánh giá là loại vaccine tả tốt nhất thế giới hiện nay sẽ là một giải pháp phòng bệnh trước sự bùng phát của dịch tiêu chảy cấp do phẩy khuẩn tả.

Theo các chuyên gia dịch tễ thuộc Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, hiệu quả của vaccine tả chỉ đạt khoảng 66 -70% và có tác dụng trong thời gian ngắn.

Do đó, uống vaccine không phải là biện pháp tối ưu trong phòng chống dịch mà chỉ là một biện pháp hỗ trợ. Người dân cần tiếp tục thực hiện nghiêm túc các biện pháp dự phòng ăn chín uống sôi, rửa tay sạch, giữ gìn vệ sinh môi trường [17].

### ***Điều trị***

- Nhanh chóng bù lượng nước và muối bị mất do tiêu chảy bằng dung dịch nước. Uống dung dịch nước điện giải. Có thể uống nước điện giải đã chuẩn bị sẵn hoặc do cơ quan y tế cung cấp (Oresol). Những trường hợp nặng phải truyền dịch, chú ý không được uống các loại thuốc làm giảm đi ngoài. Cung cấp nước và chất điện giải là biện pháp quan trọng nhất đối với bệnh này.

- Xử lý vệ sinh khu vực có nhiễm phân bệnh nhân bằng cloramin B 10%. Tẩy trùng vật dụng cá nhân bằng nước Javen, nước sôi, cloramin 2%, không nên dùng vôi bột để khử trùng, vùng nguy cơ có thể sử dụng vaccine tả. [17].

## **1.4. NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM DO *VIBRIO CHOLERA***

### ***Ngộ độc do ăn tiết canh***

Trong huyết tươi có rất nhiều vi trùng, virus còn sống. Người ăn tiết canh thường cho thêm chanh vào để vi trùng co lại vì axit. Người ăn tiết canh có thể bị

lây trực tiếp rất nhiều bệnh từ máu huyết của động vật, do máu tươi vào bao tử người sẽ thấm rất nhanh qua niêm mạc bao tử, thấm thẳng vào máu ngay lập tức.

Quá trình thọc tiết lợn không đảm bảo vệ sinh trong những điều kiện như nước bị nhiễm độc, nhiễm chì hay bị dính phân... đều bị nhiễm *V. cholerae* trực tiếp với cơ thể người ăn tiết canh sau đó [19].

## **1.5. NGUYÊN NHÂN ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH CỦA *VIBRIO CHOLERAE***

Việc sử dụng kháng sinh tràn lan trong những thập kỷ vừa qua đã dẫn đến sự xuất hiện rất nhiều chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh và tạo nên một mối nguy cơ toàn cầu trầm trọng đe dọa nền y học hiện đại. Cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm đều có khả năng đề kháng lại các thuốc điều trị vi sinh vật. Các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh (một số lớn trong đó có khả năng đa đề kháng) xuất hiện gần đây và là nguyên nhân của những mối lo ngại gồm: các tác nhân gây bệnh tiêu chảy như *Shigella*, *Salmonella*, *E coli* và *Enterococcus faecium*; các tác nhân gây bệnh đường hô hấp như *Klebsiella pneumoniae* và *P. aeruginosa*; gây bệnh đường tiết niệu như *E coli*, *M. tuberculosis*, [14]. Theo Nguyễn Đức Hiền, Viện các bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới quốc gia ngày 23/4/2010 đưa ra cảnh báo, đã có hai trong số bốn loại kháng sinh cũ trước đây thường dùng đặc trị vi khuẩn tả bị kháng thuốc tại Việt Nam. Tetracyclin, có tác dụng tốt với tiêu chảy do *Vibrio cholerae*. Ciprofloxacin, norfloxacin, kháng sinh nhóm quinolon có dạng uống và metronidazol.

Có ba cơ chế thường gặp của hiện tượng đề kháng kháng sinh ở vi khuẩn:

- Thay đổi vị trí đích tác động.
- Thay đổi sự thu nhận kháng sinh
- Bất hoạt kháng sinh.

## CHƯƠNG 2

### NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM

Thời gian thực hiện đề tài: từ tháng 02 năm 2011 đến tháng 4 năm 2012

Địa điểm lấy mẫu: Thành phố Trà Vinh và một số huyện trong tỉnh Trà Vinh: Châu Thành, Duyên Hải, Cầu Ngang, Càng Long.

Địa điểm xét nghiệm:

- Bệnh viện Đa khoa Trung ương Cần Thơ,
- Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ,
- Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

#### 2.2 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Phân lập vi khuẩn *Vibrio cholerae* trên các loại mẫu:

- Mẫu huyết heo (Thành phố Trà Vinh, huyện Châu Thành, huyện Duyên Hải, huyện Cầu Ngang, huyện Càng Long)
- Mẫu nghêu (huyện Duyên Hải, huyện Cầu Ngang)
- Mẫu phân (lấy từ bệnh nhân tiêu chảy tại bệnh viện Đa khoa Trà Vinh)

#### 2.3. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

##### Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống PCR, tủ sấy, tủ ấm, tủ lạnh, autoclave, máy lắc, buồng cấy vô trùng và kính hiển vi.

Cân điện tử, ống nghiệm, đĩa petri, chai, ống đong, ống hút, lam, kẹp, kéo, tấm bông vô trùng, găng tay, đèn cồn, túi nilon và thùng trữ lạnh.

##### Hóa chất và môi trường

###### Các loại môi trường

- Môi trường chuyên chở mẫu bệnh phẩm: Cary- Blair.
- Môi trường nuôi cấy:
  - + Pepton kiềm APW: Alkaline Peptone Water
  - + TCBS: Thạch Thiosulfat-Citrat-Bile-muối-Saccharose
  - + TSA (Thạch tryptone muối 2%)

- + TSI (Triple Sugar Iron)
- + KIA (Kligler Iron Agar)
- Môi trường làm kháng sinh đồ: Mueller Hinton Agar.

### **Đĩa kháng sinh**

- + Nhóm Beta - Lactam: Ampicillin, amoxicillin, cephalexin.
- + Nhóm Tetracyclin: Tetracycline
- + Nhóm Fluoroquinolone: Ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin,
- + Nhóm Phenicol: Chloramphenicol.
- + Nhóm Macrolid: Azithromycin.

### **Bộ thuốc nhuộm Gram**

#### **Bộ kháng huyết thanh định type *V. cholerae* (Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh)**

1. Kháng huyết thanh tả đa giá bao gồm 3 chủng: Inaba, Ogawa và O139.
2. Kháng huyết thanh tả đơn giá Inaba
3. Kháng huyết thanh tả đơn giá Ogawa
4. Kháng huyết thanh tả đơn giá O139

### **Một số vật liệu khác**

- Khoanh giấy thử nghiệm oxidase và các loại thuốc thử.
- Các khoanh giấy kháng sinh.
- Thẻ (Card) thử nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu.

## **2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Thiết kế nghiên cứu:** Được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang:

**Cỡ mẫu nghiên cứu (Trần Thị Dân, 2006)**

$$n = \frac{Z^2_{(1-\alpha/2)} p (1-p)}{d^2}$$

n: cỡ mẫu tối thiểu; p: Tỷ lệ cân đối = 0,25

d : Sai số tương đối cho phép = 0,05



$Z_{1-\alpha/2}$ : Hệ số tin cậy, chọn độ tin cậy là 95%  $\rightarrow Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ .

**Chọn mẫu ( $n = n_1 + n_2 + n_3$ )**

-  $n_1$  = mẫu phân (40 mẫu)

-  $n_2$  = mẫu nghêu (160 mẫu)

-  $n_3$  = mẫu huyết (100 mẫu). **Tổng cộng: 300 mẫu**

## 2.5 NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Lấy mẫu:

Thời gian lấy mẫu cho tất cả các loại được chia làm 3 đợt: tháng 3 - 6/2011; tháng 8 - 11/2011; tháng 4 - 6/2012.

Dụng cụ bao gồm: ống tiêm nhựa 5ml vô trùng dùng lấy mẫu huyết heo, tăm bông chứa trong môi trường chuyên chở Cary - Blair, phích trữ lạnh.

+ Mẫu huyết heo có pha nước với nồng độ muối từ 2- 3% được lấy tại các cơ sở giết mổ ở thành phố Trà Vinh, huyện Châu Thành, Duyên Hải, Cầu Ngang, Càng Long.

+ Nghêu: Lấy mẫu ở một số vùng thuộc huyện Duyên Hải, Cầu Ngang.

+ Phân: Người tiêu chảy ở bệnh viện Đa khoa Tỉnh Trà Vinh.

- Nuôi cấy mẫu xác định tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên các loại mẫu huyết heo, nghêu và phân trên người tiêu chảy.

- Thử độ nhạy kháng sinh đối với *Vibrio cholerae* được phân lập bằng kỹ thuật khoan giấy kháng sinh và xác định nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)

- Định type tìm chủng vi khuẩn phổ biến gây bệnh tiêu chảy tại tỉnh Trà Vinh.

### 2.5.1. Xác định tỷ lệ phân lập của các chủng *Vibrio cholerae* và type sinh học

#### Phương pháp lấy bệnh phẩm

**Mẫu phân (1)** (Theo Đặng Chi Mai, 2006).

Lấy mẫu phân người tiêu chảy có nguy cơ (ở vùng xảy ra dịch bệnh, vùng bị ô nhiễm nguồn nước, ăn thức ăn hải sản, tiếp xúc với người bệnh có triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh tả...).

Phân được thu thập sớm, trước khi điều trị kháng sinh, được bảo quản ở môi trường vận chuyển Cary-Blair, vi khuẩn tả có thể sống 4 tuần trong môi trường này. Có thể sử dụng môi trường giàu dinh dưỡng làm môi trường vận chuyển: nước pepton kiềm và canh thang pepton tellurite-taurocholate. Các mẫu bệnh phẩm giữ trong môi trường vận chuyển nên gửi tới phòng thí nghiệm, không để trong tủ lạnh vì vi khuẩn tả rất nhạy cảm ở tủ lạnh [8].

### **Mẫu nghêu (2)** (Theo Nguyễn Ngọc Tuân, 2012)

Lấy mẫu nghêu được thu thập từ các huyện Cầu Ngang, Duyên Hải, mẫu vừa thu hoạch từ 3 đến 5 giờ, mẫu còn tươi không có mùi.

Mẫu nghêu sau khi rửa sạch chất bẩn bên ngoài, dùng kẹp vô trùng tách hai vỏ, lấy phần thịt và dịch bên trong cho vào cốc thủy tinh vô trùng, cắt nhuyễn.

Phần mẫu cắt nhuyễn 10g được tăng sinh trong 90ml môi trường nước pepton muối kiềm APW, bổ sung 2% muối.

### **Mẫu huyết heo (3)** (Theo Lê Văn Phụng, 2007)

Mẫu huyết heo được lấy tại các cơ sở giết mổ khoảng (10ml/mẫu), cho vào ống tiêm vô trùng. Mẫu huyết lấy sau khi có pha nước và một ít muối (khoảng 2-3%), mẫu được cho vào ống tiêm nhựa vô trùng, bảo quản trong phích trữ lạnh.

## **Các bước phân lập** (*Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae, Centers for Disease Control and Prevention*)

### **(1) Xác định một số đặc tính nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio cholerae***

#### **Môi trường tăng sinh (pepton kiềm: PAW)**

Là môi trường pepton kiềm có muối, với tính chọn lọc, môi trường này chỉ cho phép vi khuẩn *Vibrio cholerae* phát triển và ngăn cản sự phát triển của những vi khuẩn cạnh tranh khác.

Phương pháp tiến hành: Cho 10g mẫu đã nghiền nhuyễn vào 90ml APW (tỉ lệ 1/10), ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 8- 12 giờ.

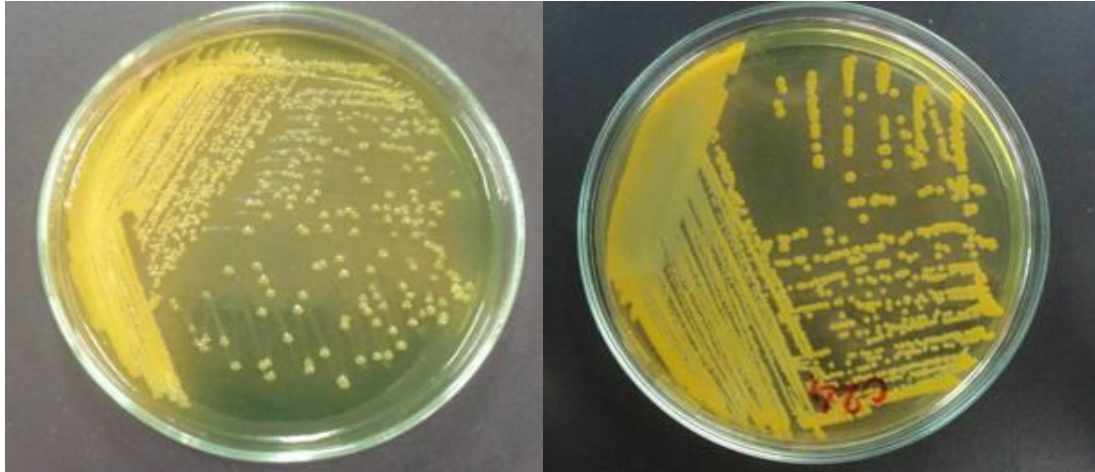
**Kết quả:** Chỉ có vi khuẩn *Vibrio cholerae* phát triển tốt ở môi trường này.

## Môi trường phân lập TCBS (Thiosulfat-Citrat-Bile-Salt)

Môi trường dùng nhận dạng về hình thái khuẩn lạc *Vibrio cholerae*.

Phương pháp tiến hành: Lấy một ít sinh khối bằng khuyên cấy từ môi trường tăng sinh cấy chuyển lên mặt thạch TCBS, ủ ở 37°C trong 18 - 24 giờ.

**Kết quả:** Trên môi trường TCBS khuẩn lạc *Vibrio cholerae* tròn nhẵn, màu vàng (do vi khuẩn lên men Sucrose), đường kính từ 2-3mm.



**Hình 2.1: Khuẩn lạc trên môi trường TCBS**

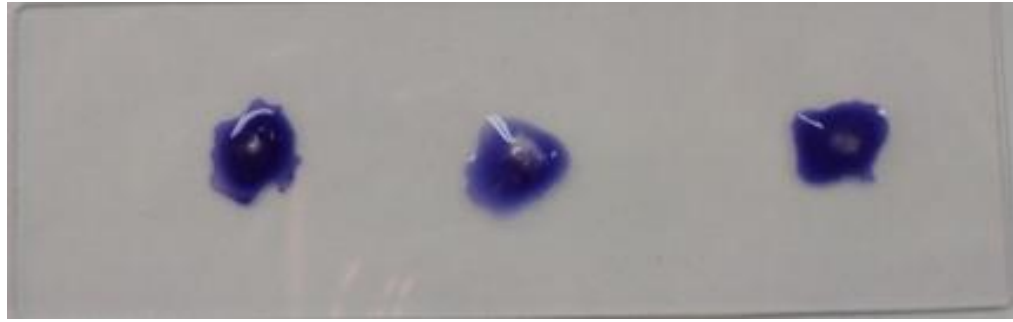
## (2) Xác định một số đặc tính sinh hoá của vi khuẩn *Vibrio cholerae*

### Thử nghiệm oxidase

Đặt khoanh giấy thử oxidase lên lamel, nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô trùng vừa đủ lên khoanh giấy. Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc từ môi trường TCBS tán đều lên đĩa giấy oxidaza. Đọc kết quả trong vòng 10 giây đến 1 phút.

**Kết quả:** Dương tính: *Vibrio cholerae* làm khoanh giấy có màu tím thẫm hoặc tím đen.

Âm tính: Khoanh giấy thử oxidase giữ nguyên màu tím nhạt ban đầu



Dương tính

Âm tính

Dương tính

**Hình 2.2: Kết quả thử oxydase**

**Thử nghiệm trên môi trường TSI (Triple Sugar Iron)**

Môi trường thạch Triple Sugar Iron được sử dụng để nuôi cấy trực tiếp cho trực khuẩn gram âm lên men đường glucose, lactose, sucrose và sinh H<sub>2</sub>S đây là đặc điểm cơ bản trong phân loại bước đầu của các trực khuẩn gram âm.

Phương pháp tiến hành: Cấy chuyên các khuẩn lạc điển hình từ môi trường TCBS vào các ống thạch nghiêng TSI, nới lỏng các nắp ống để tạo điều kiện hiếu khí, nuôi ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 18 - 24 giờ.

**Kết quả:** Trên môi trường TSI, *Vibrio cholerae* làm phần thạch nghiêng có màu đỏ và thạch đứng của môi trường chuyển màu vàng, không sinh hơi và không sinh H<sub>2</sub>S.



(1) dương tính



(2) dương tính; âm tính

**Hình 2.3: Kết quả thử sinh hóa (1). Kết quả thử lên men đường glucose;**

**(2). Kết quả thử khả năng sử dụng tryptophan (Indol)**

**Thử nghiệm indol:** nhỏ thuốc thử Kovac's SIM (H<sub>2</sub>S – Indol – Mobility) lên ống môi trường, lắc nhẹ. Đọc kết quả trong vòng 2 phút.

**Kết quả:** Dương tính: Có quầng màu đỏ nổi lên trên bề mặt môi trường

Âm tính: Có quầng màu vàng nổi lên trên bề mặt môi trường

### ***(3) Phương pháp định danh bằng phản ứng huyết thanh học.***

Kháng huyết thanh chẩn đoán vi khuẩn *V. cholerae* (vi khuẩn tả) điều chế từ máu thỏ được miễn dịch với các serotype (type huyết thanh): Inaba, Ogawa và O139, lọ 3ml.

#### ***Các loại kháng huyết thanh chẩn đoán vi khuẩn tả***

- Kháng huyết thanh tả đa giá bao gồm 3 chủng: Inaba, Ogawa và O139.
- Kháng huyết thanh tả đơn giá Inaba
- Kháng huyết thanh tả đơn giá Ogawa
- Kháng huyết thanh tả đơn giá O139

Làm phản ứng ngưng kết trên lam kính với kháng huyết thanh tả đa giá và đơn giá. Đây là phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính dựa trên nguyên tắc kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu của *V. cholerae*.

Chủng vi khuẩn thuần khiết phân lập được có phản ứng sinh hóa phù hợp sẽ được sử dụng thử kháng huyết thanh. Chuẩn bị phiến kính thật sạch, trong suốt:

- Nhỏ 1 giọt kháng huyết thanh tả đa giá lên phiến kính sạch và một giọt nước muối sinh lý 0,9 % lên một vị trí khác của phiến kính.

- Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc từ môi trường NA Saline (môi trường dùng giữ giống vi khuẩn *V. cholerae*) lên giọt kháng huyết thanh, dùng que cấy vô trùng khác chuyển vi khuẩn lên giọt nước muối sinh lý rồi tán đều vi khuẩn.

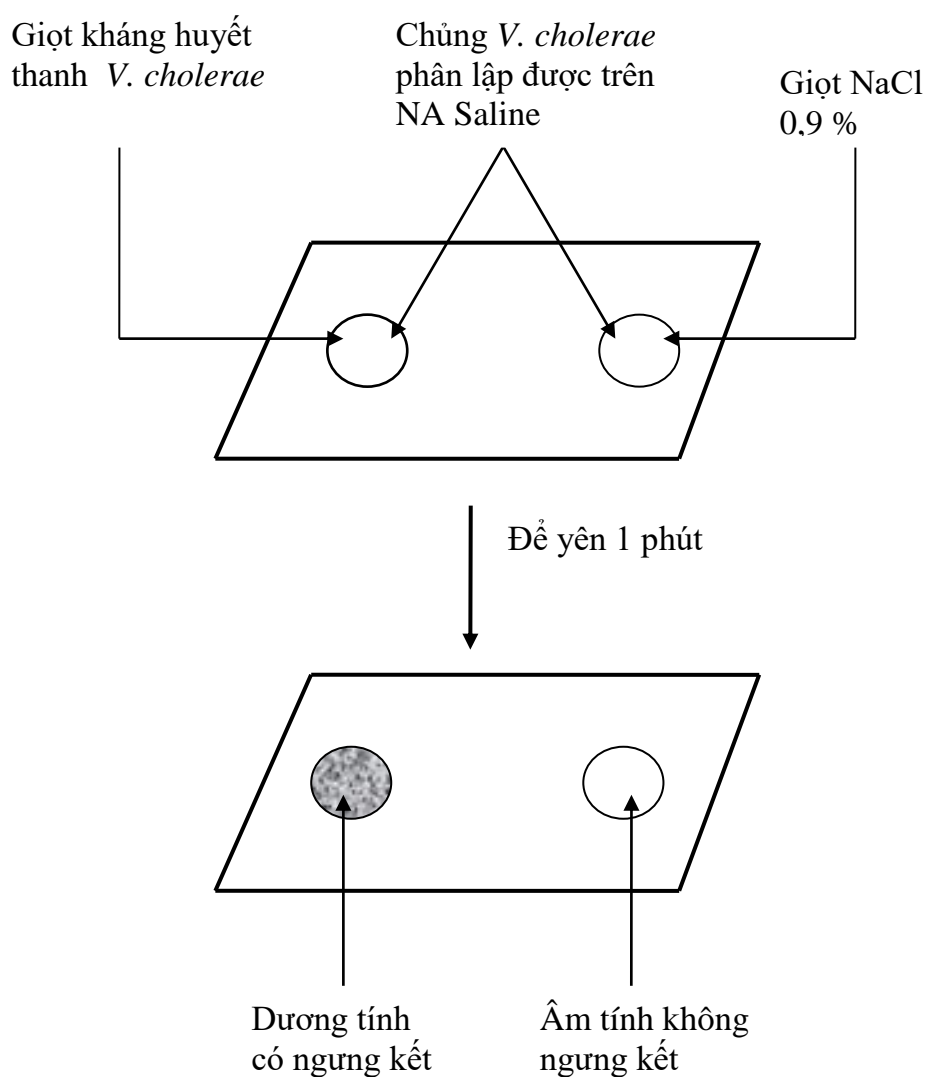
- Lắc tròn nhẹ nhàng huyền dịch cho đồng nhất.

- Quan sát phản ứng ngưng kết xảy ra trong 30 giây.

Kết luận dương tính khi có hiện tượng ngưng kết ở giọt có kháng huyết thanh và không có hiện tượng ngưng kết ở giọt nước muối sinh lý.

Khi khuẩn lạc dương tính với kháng huyết thanh đa giá gồm 3 chủng: Inaba, Ogawa và O139, tiếp tục ngưng kết với kháng huyết thanh đơn giá để xác định serotype gây bệnh.

**Kết quả:** Vi khuẩn dương tính với KHT đa giá gồm 3 chủng Inaba, Ogawa và O139 và dương tính với KHT Ogawa và Inaba.



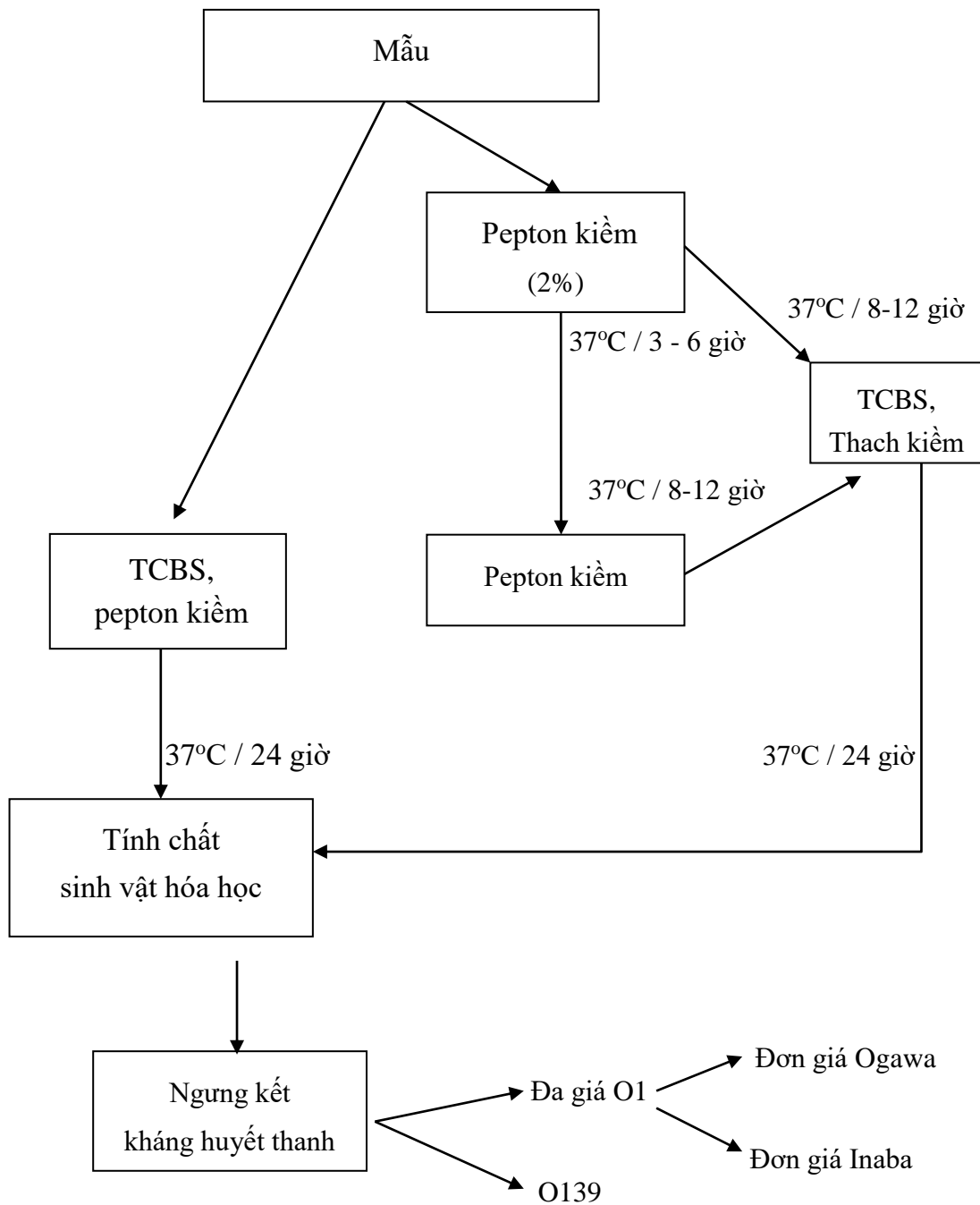
**Hình 2.4. Xác định type huyết thanh *V. cholerae***

(Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh)

**Bảng 2.1: Tóm tắt thử nghiệm kháng huyết thanh *V. cholerae***

<b>Kháng nguyên</b>	<b>Kháng huyết thanh Inaba</b>	<b>Kháng huyết thanh Ogawa</b>	<b>Dung dịch muối sinh lý</b>	<b>Kết luận</b>
<i>V. cholerae</i> O1	+	-	-	Chủng Inaba
<i>V. cholerae</i> O1	-	+	-	Chủng Ogawa
<i>V. cholerae</i> O1	+	+	-	Chủng đa giá
<i>V. cholerae</i> O1	-	-	-	Chủng không đặc hiệu

4) Tóm tắt sơ đồ phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Vibrio cholerae*



Sơ đồ 2.1: Phân lập *Vibrio cholerae*

(Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*, Centers for Disease Control and Prevention)



## 2.5.2 Xác định tính đề kháng kháng sinh của các chủng *Vibrio cholerae* bằng kỹ thuật khoan giấy kháng sinh và MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

Chọn lựa kháng sinh thích hợp đối với vi khuẩn đường ruột thường được sử dụng để điều trị bệnh dịch tả. Chúng tôi sử dụng các loại kháng sinh của các nhóm kháng sinh sau đây, theo khuyến cáo của CLSI (Clinical and Laboratory Institute, tháng 01 năm 2010).

- Nhóm Beta - Lactam: Chọn amoxicillin.
- Nhóm Tetracyclin: Chọn tetracycline
- Nhóm Fluoroquinolone: Chọn norfloxacin,
- Nhóm Phenicol: Chọn chloramphenicol.
- Nhóm Macrolid: Chọn azithromycin.

**Bảng 2.2: Tiêu chuẩn đánh giá sự nhạy cảm đối với kháng sinh của vi khuẩn đường ruột.**

Kháng sinh	Ký hiệu	Hàm lượng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
			Đề kháng	Trung gian	Nhạy
Amoxicillin	Ax	10µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Tetracycline	Te	30µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Norfloxacin	Nr	10µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Chloramphenicol	Cl	30µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Azithromycin	Az	30µg	≤ 13	14-17	≥ 18

(Nguồn: Clinical and Laboratory Standards Institute, 02/2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement).

### (1) Phương pháp dùng đĩa giấy kháng sinh (Kirby-Bauer).

\* Nguyên lý: Các chủng vi khuẩn sẽ nhạy cảm với các loại kháng sinh ở mức độ khác nhau và chúng thể hiện sự khác nhau đó bằng đường kính vùng ức

chế ở xung quanh khoanh giấy kháng sinh khi có sự tiếp xúc giữa vi khuẩn và kháng sinh.

Tiến hành:

(1) Trải vi khuẩn lên mặt thạch từ 15 phút sau khi đã pha huyền dịch vi khuẩn.

(2) Đặt khoanh giấy kháng sinh tiếp xúc phẳng với mặt thạch, sao cho khoảng cách các đĩa kháng sinh từ 20 – 24mm.

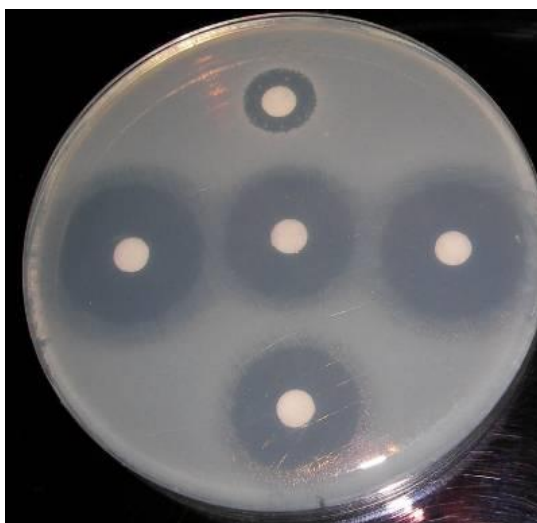
(3) Lật ngược đáy hộp thạch ủ ở 37 °C từ 18 đến 24 giờ

Đọc và nhận định kết quả

- Sau khi ủ 18 đến 24 giờ, đọc kết quả các hộp thạch, vùng ức chế sẽ là một vòng tròn xung quanh khoanh giấy kháng sinh không có vi khuẩn mọc chúng ta thấy được bằng mắt thường. Đo đường kính vùng ức chế, kể cả đường kính khoanh giấy kháng sinh.

- Đo đường kính tính ra milimét với mẫu thước dành riêng cho mục đích này, bằng cách áp thước lên mặt sau của đáy hộp thạch.

- So vào bảng giới hạn vùng ức chế của *Vibrio cholerae*, và ghi nhận kết quả vi khuẩn nhạy, trung gian hay đề kháng đối với kháng sinh thử nghiệm.



**Hình 2.5: Kết quả kháng sinh đồ**

## **(2) Phương pháp sử dụng máy làm kháng sinh đồ tự động tìm giá trị MIC**

### **\* Nguyên lý**

Máy làm kháng sinh đồ tự động là hệ thống tự động báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất, cho kết quả kháng sinh đảm bảo có độ chính xác cao bởi giá trị nồng độ ức chế tối thiểu riêng biệt cho 18 – 20 loại kháng sinh khác nhau.

Thẻ xét nghiệm làm kháng sinh đồ được phủ từ 18 - 20 loại kháng sinh khác nhau, các loại thẻ này bao gồm 64 giếng với nhiều nồng độ dựa trên giá trị nồng độ ức chế tối thiểu và môi trường nuôi cấy.

### **\* Tiến hành**

Huyền dịch vi khuẩn: những khuẩn lạc được ly trích từ môi trường MC pH = 8 đã ủ qua đêm thật sự thuần nhất hòa tan vào tube chứa 3ml nước muối vô trùng 0,45% để tạo thành huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với độ đục chuẩn MacFarland 0,5 trong thời gian 15 phút. Cho từng thẻ (card) làm kháng sinh đồ vào từng tube chứa huyền dịch trên, sau đó đặt vào máy làm kháng sinh đồ tự động, đọc kết quả sau 8 – 12 giờ.



**Hình 2.6: Huyền dịch vi khuẩn**



**Hình 2.7: Thẻ (card) kháng sinh đồ**

**Bảng 2.3: Kết quả nồng độ MIC của các kháng sinh đối với vi khuẩn *V. cholerae***

<i>Kháng sinh</i>	<i>Ký hiệu</i>	<i>Lượng kháng sinh</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Nồng độ MIC</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Amoxillin	Ax	10	4
Tetracycline	Te	30	< 1
Norfloxacin	Nr	10	0.25
Chloramphenicol	Cl	30	2
Azithromycin	Az	30	< 1

### 2.5.3 Các chỉ tiêu theo dõi

- Xác định tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên huyết heo, ghê và phân trên người tiêu chảy.
- Mức độ nhạy cảm kháng sinh và nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế vi khuẩn.
- Xác định type huyết thanh phổ biến có trên các loại mẫu có thể gây bệnh cho người.

**Xử lý số liệu:** Xử lý kết quả bằng chương trình Excel.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ THẢO LUẬN

#### 3.1 Đánh giá tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên các loại mẫu phân lập

Tỉ lệ nhiễm vi khuẩn *V. cholerae* trên các loại mẫu như huyết heo, nhuyễn thể (nghêu) và người bệnh tiêu chảy ở tỉnh Trà Vinh, chúng tôi đã phân lập và tổng hợp với kết quả sau:

**Bảng 3.1: Tổng hợp tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên các loại mẫu**

Loại mẫu	Số mẫu kiểm tra	Dương tính	
		Số mẫu	Tỉ lệ (%)
Huyết heo	100	04	4
Nghêu	160	16	10
Phân	40	0	0
Tổng	300	20	<b>6,7</b>

Qua bảng cho thấy:

\* Tỉ lệ nhiễm *V. cholerae* trên huyết heo được phân lập chung cho các huyện và tại thành phố Trà Vinh là 4%. Trên loại mẫu này chúng tôi muốn tìm hiểu về khả năng ô nhiễm nguồn nước có liên quan đến huyết heo được thu và xử lý tại lò mổ, hiện nay vẫn chưa có những báo cáo liên quan đến tỉ lệ nhiễm *V. cholerae* trên huyết heo.

\* Tỉ lệ nhiễm *V. cholerae* trên nghêu được phân lập ở 2 huyện Cầu Ngang và Duyên Hải là 10%, bằng cách sử dụng môi trường tăng sinh pepton kiềm có 2% NaCl và môi trường thạch chuyên biệt TCBS để phân lập.

Tỉ lệ phân lập trên nhuyễn thể cũng được xác định tại Đồng Nai và thành phố Hồ Chí Minh bằng dung dịch pepton kiềm có bổ sung muối từ 2 -3 % để tăng sinh cũng cho kết quả 10,7% [5].

\* Trên người: qua 40 mẫu phân tiêu chảy được thu thập tại bệnh viện đa khoa Trà Vinh, trong 40 mẫu phân, có 12 mẫu được lấy từ bệnh nhân có độ tuổi

từ 5 - 10 và 28 mẫu có độ tuổi từ 35 – 80, nhận thấy không có mẫu dương tính với vi khuẩn tả *V. cholerae*, do trên địa bàn tỉnh Trà Vinh không phải là ổ dịch của vi khuẩn tả, hơn nữa những triệu chứng của bệnh nhân khi chúng tôi lấy mẫu phân không có dấu hiệu điển hình của bệnh tả như tiêu chảy lỏng màu hơi đục hoặc ói dữ dội.

Trong năm 2010, Bến Tre là một trong 8 tỉnh của vùng đồng bằng sông Cửu Long có nhiều người mắc bệnh tả.

Theo kết quả nghiên cứu ứng dụng một số kỹ thuật chẩn đoán nhanh *Vibrio cholerae* gây tiêu chảy cấp tại tỉnh Thái Nguyên năm 2009 trên 270 mẫu bệnh nhân tiêu chảy cấp có triệu chứng lâm sàng nghi mắc bệnh tả cũng chỉ phân lập được 5,93% bệnh nhân dương tính với bệnh tả [6].

### 3.1.1 Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên huyết heo có pha nước muối

Sự hiện diện của vi khuẩn *Vibrio cholerae* có mặt trong nguồn nước tại các cơ sở giết mổ khi sử dụng có pha muối với nồng độ 2-3%.

**Bảng 3.2: Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên huyết heo có pha nước muối**

Loại mẫu	Số mẫu kiểm tra	Dương tính	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Huyết heo có pha nước muối	100	04	4

Qua thu thập mẫu huyết tại các cơ sở giết mổ, chúng tôi ghi nhận hàm lượng muối có thêm vào trong nước cùng với huyết từ 2-3% với hàm lượng này *Vibrio cholerae* có thể tồn tại và nếu có điều kiện sẽ nhiễm vào thức ăn gây tiêu chảy trên người.

Nếu trong quá trình thọc tiết heo không đảm bảo vệ sinh trong những điều kiện như nước bị nhiễm độc, nhiễm chì hay bị dính phân... đều bị nhiễm *V. cholerae* sẽ nhiễm cho người ăn tiết canh. Bệnh tả lây qua đường tiêu hóa do ăn uống phải thức ăn bị nhiễm vi khuẩn tả. Nước, thực phẩm (lòng heo, tiết heo, thịt chó, nghêu, sò hến, tôm,...), rau quả, bàn tay, dụng cụ ăn uống, ruồi nhặng,

chuột, gián... nhiễm khuẩn đều có thể làm lây lan bệnh. Bệnh tả thường lây lan nhanh theo cùng bếp ăn, theo nguồn nước bị ô nhiễm [43].

Ở Đồng bằng sông Cửu Long, dịch bệnh đã xảy ra vào năm 2010, trong đó Bến Tre có hơn 50 người dương tính với vi khuẩn tả do sử dụng nước từ môi trường ô nhiễm (Phuong Như, 2010)

Có nhiều nghiên cứu cho thấy nguồn nước là yếu tố lây lan mầm bệnh, là điều kiện để vi khuẩn tồn tại và phát tán. Nhiều quốc gia trên thế giới cũng có những nghiên cứu liên quan đến nguồn nước gây ô nhiễm, người nhiễm vi khuẩn do uống nước hoặc ăn phải thức ăn nhiễm vi khuẩn này, nhiều bằng chứng dịch tễ học cho thấy môi trường nước đóng vai trò quan trọng trong lưu trữ mầm bệnh, hơn 50% người bị nhiễm vi khuẩn *Vibrio cholerae* là do sử dụng nguồn nước bị ô nhiễm [30].

### 3.1.2 Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên nghêu theo huyện

Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên nghêu của huyện Cầu Ngang và huyện Duyên Hải được thu thập mẫu trong cùng một thời điểm, số lượng mẫu (80/80), cách xử lý và bảo quản mẫu như nhau.

**Bảng 3.3: Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên nghêu theo Huyện**

Huyện	Số mẫu kiểm tra	Dương tính	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Duyên Hải	80	05	6.25
Cầu Ngang	80	11	13.75
Tổng	160	16	10

Qua bảng chúng tôi nhận thấy tỷ lệ dương tính với *Vibrio cholerae* trên nghêu của huyện Cầu Ngang là 13.75% cao hơn so với tỷ lệ dương tính với *Vibrio cholerae* trên nghêu của huyện Duyên Hải là 6,25%, tuy nhiên sự chênh lệch này không có ý nghĩa thống kê ( $P = 0,111$ ). Để giải thích rõ hơn về kết quả trên cần phải có những nghiên cứu phân tích về thành phần vi sinh và nồng độ

muối có trong nguồn nước biển của 2 huyện, vì hiện nay chưa có những thông tin về số liệu nhiễm *Vibrio cholerae* trên các mẫu trên tại tỉnh Trà Vinh.

Đặc tính của vi khuẩn *Vibrio cholerae* là thích nghi và tồn tại được ở môi trường nước có nồng độ muối thích hợp 2%, 3% và 4%, chúng sống rất phổ biến ở biển và các cửa sông và sông bên trong của loài hải sản [22]. Nguồn thực phẩm chứa nhiều vi khuẩn *Vibrio cholerae* vẫn là các loại thức ăn hải sản như tôm, cua, sò, nghêu, hào. Người sẽ bị nhiễm *Vibrio cholerae* khi ăn sống hoặc chưa nấu chín các loại hải sản trên hoặc uống hay tiếp xúc các loại nước có nhiễm vi khuẩn *Vibrio cholerae*, nhất là nước có độ mặn từ 2- 3% muối [29]. Ở Khánh Hòa (Việt Nam), từ năm 1997 đến 1999 có 548 ca nhiễm *V.parahaemolyticus*, đây là loài thường xuất hiện phổ biến cùng với *V. cholerae*, và Khánh Hòa cũng là vùng ven biển, thức ăn sử dụng đa số là hải sản [16], [20].

Theo báo cáo thường niên của Trung tâm kiểm soát dịch bệnh thế giới năm 2011(CDC), thức ăn hải sản cũng được chứng minh về tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* ở nhiều nước trên thế giới: hào 65%, tôm 52%, cua 29%, nghêu 11% (CDC, 2011) [19].

Ở các nước Châu Âu, các bang của nước Mỹ thức ăn có nguồn gốc từ hải sản vẫn được xem là nguyên nhân chiếm tỉ lệ gây bệnh do *Vibrio cholerae* là cao nhất từ 89 - 99% đã được thống kê từ năm 1999 đến năm 2008, trong đó thức ăn hải sản có vỏ như hào, nghêu được bệnh nhân sử dụng chiếm 30 – 70% (CDC, 1999- 2011).

### **3.1.3 Tỉ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên huyết heo theo huyện**

Trên 100 mẫu huyết được thu thập, chúng tôi chọn lấy mẫu ngẫu nhiên 20 mẫu huyết heo tại mỗi cơ sở giết mổ ở nhiều thời điểm khác nhau.



**Bảng 3.4: Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* trên huyết heo theo Huyện**

Huyện	Số mẫu kiểm tra	Dương tính	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Duyên Hải	20	0	0
Cầu Ngang	20	0	0
Châu Thành	20	04	20
Càng Long	20	0	0
Thành Phố TV	20	0	0
Tổng	100	04	4

Kết quả cho thấy tại cơ sở giết mổ heo thuộc huyện Châu Thành có 20% số mẫu được phân lập nhiễm vi khuẩn *Vibrio cholerae*, tỷ lệ này cũng khá cao so với tỷ lệ nhiễm đã được phân lập trên nghêu của các huyện (10%).

Tuy nhiên, chưa có những nghiên cứu về sự hiện diện của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trên huyết heo, nhưng đối với thịt chó đã phân lập được 13% vi khuẩn *Vibrio cholerae* tại các cơ sở giết mổ ở Hà Nội nhập từ nước ngoài [43].

Tại tỉnh Bến Tre, theo báo cáo từ Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh và Trung tâm Y tế dự phòng Bến Tre, tính đến ngày 22/7/2010, trên địa bàn tỉnh Bến Tre đã ghi nhận 69 bệnh nhân tiêu chảy cấp và đều dương tính với vi khuẩn tả, bệnh nhân tập trung ở ba huyện là Mỏ Cày, Mỏ Cày Bắc và huyện Giồng Trôm. Sau khi sử dụng nước đá, thực phẩm không rõ nguồn gốc, nước kênh rạch làm nước sinh hoạt... các trường hợp trên đều có biểu hiện đau bụng, đi ngoài phân lỏng nhiều lần trong ngày, kèm nôn và đa số các trường hợp tiêu chảy cấp tại Bến Tre hầu hết đều có tiền sử uống nước đá không được xử lý (Đ.Tuyên, 2010). Tháng 7 năm 2010 một chủng *Vibrio cholerae* O139 cũng được phân lập từ 7 mẫu nước đá ở Nam Định miền Bắc Việt Nam [21], [26].

Như vậy với tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* phân lập được trên mẫu huyết có sử dụng nguồn nước tại cơ sở, điều đó chứng tỏ nước có khả năng là nguồn lây nhiễm *Vibrio cholerae*.

## 3.2 Kết quả tính nhạy cảm và đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio cholerae*.

### 3.2.1 Xác định bằng phương pháp dùng đĩa giấy kháng sinh

Nghiên cứu đã tiến hành thử kháng sinh đồ để đánh giá tính nhạy cảm của 20 chủng *Vibrio cholerae* định danh được đối với các loại kháng sinh thường sử dụng để điều trị bệnh tả. Kết quả kháng sinh đồ của các chủng *Vibrio cholerae* thể hiện qua bảng 3.6.

**Bảng 3.5: Tỷ lệ nhạy cảm và đề kháng kháng sinh đối với *Vibrio cholerae***

Kháng sinh	Ký hiệu	Số mẫu kiểm tra	Nhạy cảm		Trung gian		Kháng	
			Số mẫu (%)	Số mẫu (%)	Số mẫu (%)	Số mẫu (%)		
Amoxicillin	Ax	20	0	0	2	10	18	90
Tetracycline	Te	20	13	65	1	5	6	30
Norfloxacin	Nr	20	20	100	0	0	0	0
Chloramphenicol	Cl	20	14	70	2	10	4	20
Azithromycin	Az	20	10	50	5	25	5	25

Kết quả cho thấy *Vibrio cholerae* nhạy cảm lần lượt với norfloxacin (100%), với chloramphenicol (70%), tetracycline (65%), azithromycin (50%); đề kháng gần như hoàn toàn với amoxicillin (90%), đề kháng tương đối với tetracycline (30%), với azithromycin (25%). Kết quả trên của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Xuân Trang, Nguyễn Ngọc Tuấn [5].

Khả năng đề kháng của vi khuẩn *Vibrio cholerae* rất đa dạng, tùy thuộc vào thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Nguyên và cộng sự có những báo cáo về khả năng kháng và nhạy cảm với tetracycline và chloramphenicol của vi khuẩn *V. cholerae* O1 phân lập tại Việt Nam. Năm 1995 vi khuẩn *V. cholerae* O1 nhạy với tetracycline và

chloramphenicol, nhưng đến năm 2000 vi khuẩn *V. cholerae* O1 lại đề kháng với tetracycline và chloramphenicol [37].

Ở nước ta, các chủng *V. cholerae* phân lập ở Thừa Thiên Huế năm 2003 đều đề kháng với amoxicillin [12].

Ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010, tất cả chủng *V. cholerae* phân lập được đều nhạy với chloramphenicol (100%), đề kháng với tetracycline là 29% sấp xỉ so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi (30%) [29].

Đối với các nghiên cứu ngoài nước, năm 1995 đến 1996 ở Hồng Kông những chủng *V. cholerae* phân lập được đều nhạy cảm với chloramphenicol và với tetracycline. Nhưng đến năm 1998, *V. cholerae* phân lập được đã giảm nhạy cảm với kháng sinh chloramphenicol và tetracycline (31% và 27,6%) [45]. Điều đó cũng cho thấy việc sử dụng kháng sinh không đúng sẽ có những thay đổi về đề kháng kháng sinh đối với vi khuẩn *V. Cholerae*.

Tuy nhiên, mức độ kháng kháng sinh chloramphenicol chỉ từ (3,7- 6,5%) và tetracycline (4,3 -15,3%) [11,41,42], nhưng những nhà nghiên cứu vẫn cho là đáng kể và cần được giám sát [31].

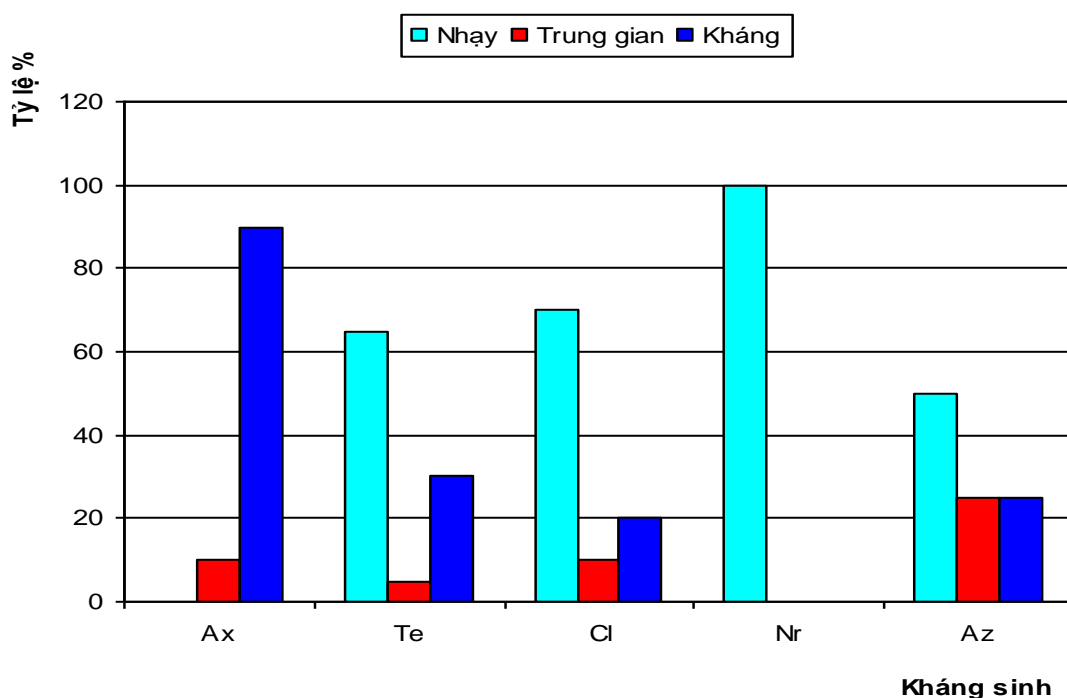
Năm 1997, một nghiên cứu ở Pondicherry Ấn Độ tất cả những chủng *Vibrio cholerae* phân lập được đều nhạy với kháng sinh tetracycline và norfloxacin là 97,5% [38], so với nghiên cứu của chúng tôi lần lượt với tỉ lệ nhạy cảm là 65% và 100%.

Ở Afghanistan và Pakistan, Rahbar cộng sự đã nghiên cứu trong năm 2005, tất cả các chủng *V. cholerae* phân lập đều nhạy cảm với tetracycline, ciprofloxacin, erythromycin và ampicillin cùng nhóm kháng sinh và có kết quả như trong nghiên cứu của chúng tôi [9].

Trong nghiên cứu của Keramat và cộng sự năm 2005, độ nhạy của hai loại thuốc tetracycline và doxycycline đối với type huyết thanh Ogawa đã được nhấn mạnh [41]. Năm 2000 Afzali và cộng sự, tại Kashan (Iran) ông đã chứng minh tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio cholerae* với ciprofloxacin, tetracycline [9].

*V. cholerae* được phân lập ở miền Bắc Ấn Độ cho thấy đã đề kháng với amoxicillin vào năm 1999 là 20%, đến năm 2002 đề kháng hoàn toàn 100% và sau đó giảm đến 14,2% trong năm 2006 [31], kết quả nghiên cứu của chúng tôi là 90% vi khuẩn *V. cholerae* đề kháng với amoxicillin.

Cũng theo Nishibori năm 2011, ở Indonesia *Vibrio cholerae* phân lập đã nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh như ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, norfloxacin. Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi [44].



**Biểu đồ 3.1: Sự nhạy cảm và đề kháng kháng sinh**

### 3.2.2 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

**Bảng 3.6: Giá trị MIC đối với *Vibrio cholerae***

<i>Kháng sinh</i>	<i>Ký hiệu</i>	<i>Lượng kháng sinh</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Nồng độ MIC</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Amoxillin	Ax	10	4
Tetracycline	Te	30	< 1
Norfloxacin	Nr	10	0.25
Chloramphenicol	Cl	30	< 2
Azithromycin	Az	30	< 1

Qua bảng nhận thấy giá trị xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với các loại kháng sinh lần lượt là  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $<1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $< 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Những nghiên cứu khác trong nước đã chứng minh nồng độ ức chế tối thiểu của tetracycline là  $3.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , chloramphenicol là  $6.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi [36].

Qua nghiên cứu tại Lào Bounnanh đã xác định nồng độ ức chế tối thiểu của tetracycline liên tục từ năm 1994 đến năm 1996 từ  $0,2 - 0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  cho. Tuy nhiên đến năm 1998 - 1999 tất cả các chủng phân lập vừa kháng tetracycline với MIC từ  $3,13 - 6,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (MIC này cao hơn 16 lần so với năm 1996). Việc thay đổi tính nhạy cảm với chloramphenicol tương tự như tetracycline [11].

Năm 1997, ở Pondicherry Ấn Độ, những chủng *Vibrio cholerae* phân lập được xác định giá trị MIC đối với kháng sinh tetracycline là  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  và norfloxacin là  $0.004 - 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  [38]. Ở Bangladesh giá trị MIC đối với kháng sinh azithromycin cũng dao động trong khoảng  $0.7 - 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  [24].

Với nồng độ ức chế tối thiểu ổn định như trên, norfloxacin và tetracycline đang được sử dụng trong điều trị bệnh tả ở nhiều nước có dịch bệnh này [24], và kết quả nồng độ MIC đối với vi khuẩn *V.cholerae* sẽ có giá trị khác nhau ở mỗi quốc gia, chỉ có norfloxacin và tetracycline có giá trị MIC gần tương

đương nhau. Điều đó cũng cho thấy tính ổn định của một vài loại thuốc kháng sinh trong điều trị đối với bệnh tả hiện nay.

### 3.3 Kết quả xác định type huyết thanh phổ biến gây bệnh tại Trà Vinh

**Bảng 3.7: Tỷ lệ nhiễm *Vibrio cholerae* theo type huyết thanh**

Type huyết thanh	Số chủng phân lập (n = 20)	
	Dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>Inaba</i> + <i>Ogawa</i> + <i>O139</i> (Đa giá)	3	15
<i>Inaba</i> (đơn giá)	2	10
<i>Ogawa</i> (đơn giá)	2	10

Sau khi định danh có kết quả 20 chủng *Vibrio cholerae* bằng các phản ứng sinh hóa và khả năng lên men các loại đường, chúng tôi tiến hành bước quan trọng cuối cùng là ngưng kết kháng huyết thanh đa giá và đơn giá để xác định nhóm huyết thanh có khả năng gây bệnh trên người.

Kết quả cho thấy có 15% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đa giá (O139, Ogawa, Inaba), 10% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và kháng huyết thanh đơn giá Inaba.

Dựa vào độc tính của vi khuẩn *Vibrio cholerae* có thể chia thành hai nhóm chính theo huyết thanh (serogroups) đó là O1 và O139. Nhóm O1 có hai type sinh học (biotype): El Tor và cổ điển; mỗi type sinh học El Tor lại chia 3 nhóm nhỏ huyết thanh: Ogawa, Inaba và Hikojima [25].

Tại Việt nam, từ 1979 đến 1981 các ca bệnh tả chủ yếu là do nhóm sinh học El Tor, nhóm phụ Ogawa; từ 1982 đến 1990 tất cả các ca bệnh tả đều nhiễm nhóm phụ Inaba; nhưng trong những năm sau 1990 thì tất cả các ca bệnh đều do nhóm phụ Ogawa. Còn ở Thái Lan, khoảng 52% các ca bệnh tả đều do nhiễm nhóm phụ Ogawa [28].

Theo Nguyễn Trần Hiền, viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cho biết, kết quả giám sát bệnh tả qua các năm từ 2002, 2003, 2004 là type huyết thanh Inaba,

và từ đầu năm 2007 đến nay các xét nghiệm đều cho kết quả vi khuẩn tả thuộc type huyết thanh Ogawa (PhanXuanTrung, 2008).

Từ 2007 đến 2010, type huyết thanh Ogawa cũng được ghi nhận ở Việt Nam, Bangladesh, Zimbabwe [29].

Ở thành phố Delhi thuộc Ấn Độ, năm 2003, *V. cholerae* O1 Ogawa chiếm ưu thế, Ogawa (54,6%) là phổ biến hơn serotype Inaba (32,5%). Tuy nhiên từ năm 2004 đến 2006 đã có một sự thay đổi, serotype Inaba lại chiếm ưu thế hơn serotype Ogawa và đến tháng 8 năm 2010, *V.cholerae* O1, type huyết thanh Ogawa cũng xuất hiện trở lại (JJM, 2011,) [25], [39].

Tháng 10 năm 2010, bệnh dịch tả xảy ra ở Haiti là do *V.cholerae* O1, thuộc type huyết thanh Ogawa gây ra, chủng đột biến đã kháng nhiều loại kháng sinh [35].

Theo tạp chí Quốc tế nghiên cứu về môi trường và sức khỏe cộng đồng 2010 cũng đã ghi nhận những mẫu phân lập từ nước, tôm, cua đều thuộc serotype Ogawa và Inaba [30].

Như vậy, với nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự hiện diện của hai serotype Inaba và serotype Ogawa qua kết quả phân lập vi khuẩn *V.cholerae* tại tỉnh Trà Vinh.

## CHƯƠNG 4

### KẾT LUẬN - ĐỀ NGHỊ

#### 4.1 KẾT LUẬN

Qua 300 mẫu được phân lập, tần số xuất hiện *Vibrio cholerae* trên nghêu là 10%, mẫu huyết heo có pha nước với nồng độ muối 2-3% tại cơ sở giết mổ là 4%, trên người tiêu chảy chưa thấy dương tính với *Vibrio cholerae*.

*Vibrio cholerae* nhạy cảm lần lượt với norfloxacin (100%), với chloramphenicol (70%), tetracycline (65%), azithromycin (50%); đề kháng gần như hoàn toàn với amoxicillin (90%), đề kháng tương đối với tetracycline (30%), với azithromycin (25%).

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với norfloxacin là 0,25 µg/µl, với tetracycline là < 1 µg/µl.

Có 15% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đa giá (O139, Ogawa, Inaba), 10% mẫu dương tính với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và kháng huyết thanh đơn giá Inaba.

#### 4.2 ĐỀ NGHỊ

##### **Các lĩnh vực có thể sử dụng những kết quả nghiên cứu**

- Đối với sở Y tế Trà Vinh sẽ có thêm thông tin về tình hình nhiễm vi khuẩn *V. cholerae* trên các loại thực phẩm, đặc biệt trên nhuyễn thể và tỉ lệ vi khuẩn đề kháng kháng sinh đang sử dụng điều trị trên người tại Trà Vinh, qua kết quả nghiên cứu đã cung cấp số liệu những chủng vi khuẩn phổ biến gây bệnh tiêu chảy do *V. cholerae* trên người, từ đó sở Y tế có định hướng phòng và điều trị bệnh phù hợp.

- Đối với Chi cục Thú y Trà Vinh, số liệu về tỉ lệ nhiễm vi khuẩn *V. cholerae* trên huyết heo phân lập được từ các cơ sở giết mổ, làm cơ sở tham khảo cho Chi cục Thú y tỉnh Trà Vinh có định hướng xây dựng quy trình vệ sinh thú y tại các cơ sở giết mổ.

- Đối với người tiêu dùng sẽ chú ý hơn về việc an toàn vệ sinh thực phẩm với các loại thực phẩm thuộc thủy sản và chăn nuôi, đặc biệt sử dụng thức ăn từ nhuyễn thể.



### **Những định hướng nghiên cứu trong tương lai**

- Cần thực hiện những nghiên cứu phân tích về vi sinh trong thành phần nguồn nước biển của 2 huyện Cầu Ngang và Duyên Hải.
- Phân tích về thành phần vi sinh trong nguồn nước sử dụng tại các cơ sở giết mổ và các khu vực nuôi trồng thủy sản trong tỉnh.
- Tăng thêm số lượng mẫu nghêu và nước theo công thức (chương 3).
- Tiếp tục xác định những loài thuộc *Vibrio* khác như: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* và những type huyết thanh phổ biến thuộc chủng *Vibrio cholerae* O1 và O139.
- Xác định tỉ lệ nhiễm *Vibrio sp.* trong thức ăn thủy sản và rau thủy sinh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### TIẾNG VIỆT

1. **Đặng Chi Mai (2006)**, *Vi khuẩn học*, ĐH Y Dược TP. HCM,
2. **Hồ Huỳnh Thùy Dương (2002)**, *Sinh học phân tử*, NXB Giáo Dục.
3. **Lê Văn Phụng (2007)**. «Một số ứng dụng của PCR trong vi sinh vật». Tạp chí Y học thực hành 2007.
4. **Nguyễn Bình Minh (2003)**, "Sự thay đổi tính nhạy cảm kháng sinh của *V. cholerae* O1 ở Việt Nam và Lào", Tạp chí Y học dự phòng, tr.27.
5. **Nguyễn Thị Xuân Trang, Nguyễn Ngọc Tuấn, 2012** “*Tần số xuất hiện Vibrio cholerae trên tôm và nhuyễn thể, xác định Serogroup O1, O139 và Biotype của V. Briocholeae bằng kỹ thuật Multiplex – PCR*”. Khoa học kỹ thuật Thú y tập XIX số 3 -2012.
6. **Phạm Thế Vũ (2008)**: “Nghiên cứu ứng dụng một số kỹ thuật chẩn đoán nhanh *Vibrio cholerae* gây dịch tiêu chảy cấp tại tỉnh Thái Nguyên năm 2008”.
7. **Trần Linh Thuớc (2001)**, *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.
8. **Trần Thị Dân, (2006)**, *Giáo trình dịch tễ học*, Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh.

## TIẾNG ANH

9. **Afzali H, Taghavi-Ardakani A, Rasa H (2001)** . Evaluation of antibiotic sensitivity of Shigella, Salmonella, and *Vibrio cholera* in patients with acute diarrhea referred to reference laboratory of Kashan University of Medical Sciences from 2000 to 2001. *Feyz* 2000; 5(19):
10. **Barnes E. (2005)**. Diseases and Human Evolution, University of New Mexico Press . Albuquerque, xii + 484pp
11. **Bounnanh Phantouamath, Noikaseumy Sithivong, Lay Sisavath, Khamphyeu Munnalath, Chomlasak Khampheng, Sithat Insisiengmay, Naomi Higa, Shige Kakinohana, and Masaaki Iwanaga (2001)**. Transition of drug susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 in Lao people's democratic republic
12. **Bani, S., Mastromarino, P. N., Ceccarelli, D., Le Van, A., Salvia, A. M., Ngo Viet, Q. T., Hai, D. H., Bacciu, D., Cappuccinelli, P. & Colombo, M. M. (2007)**. Molecular characterization of ICEVchVie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. *FEMS Microbiol Lett* 266, 42–48.
13. **Boyd, E.F., Waldor, M.K (2008)**. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 serogroup isolates. *Microbiology*. 148, pp. 1655-1666.
14. **Colwell R. R. (2004)**. Infectious disease and environment. Cholera as a paradigm for waterborne disease, *Int. microbiol*.
15. **Colwell R.R20 (2008)**. Global Climate and Infectious Disease: The Cholera Paradigm\* *Science* : Vol. 274. no. 5295, pp. 2025 – 2031.
16. **Dalsgaard A, Forslund, A., Tam, N. V., Vinh, D. X. & Cam, P. D. (1999)**. Cholera in Vietnam: Changes in Genotypes and Emergence of

Class I Integrons Containing Aminoglycoside Resistance Gene Cassettes in *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated from 1979 to 1996. J Clin Microbiol. 1999; 37: 734-41

17. **David A. Sack Dennis R. Lang (2004).** *Cholera Vaccines*. Plotkin: Vaccines, 4th ed. Copyright © [2004 Saunders](#).
18. **Davis B., Waldor M (2009).** Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. Curr Opin Microbiol. 6 (1): 35-42.
19. **DePaola, A. (1981).** *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: a literature review. J. Food Sci. 46, 66-70.
20. **Dinh Thi Tuyet, Vu Dinh Them, Lorenz von Seidlein, Ashrafazzuman Chowdhury, Eunsik, Do Gia Canh, Bui Trong Chien, Tran Van Tung và Dang Duc Trach (2002).** Clinical, Epidemiological, and Socioeconomic Analysis of an Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa Province, Vietnam.
21. **Dong Tu Nguyen, Tuan Cuong Ngo, Huy Hoang Tran, Thanh Huong Le, Hoai Thu Nguyen, (2012),** Characterization of *Vibrio cholerae* O139 of an Aquatic Isolate in Northern Vietnam, The Open Microbiology Journal, 2012, Volume 6 .
22. **Ewald, P. W, J.B Sussman, M.T.Distler, C. Libel, W.P. Chammas, V.J. Dirita (1998).** Evolutionary Control of Infectious Disease, Prospects for Vectorborne and Waterborne Pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 93(5): 567-576.
23. **Faruque S. M., Albert, M.J., and Mekalanos, J. (1998),** Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and Molecular biology reviews, p. 1301–1314.
24. **Faruque AS, Alam K, Malek MA, Khan MG, Ahmed S, Saha D, Khan WA, Nair GB, Salam MA, Luby SP, Sack DA (2007).** Emergence of

multidrug-resistant strain of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh and reversal of their susceptibility to tetracycline after two years.

- 25. Garg P, Nandy RK, Chaudhry P, Chaudhry NR, De K, Ramamurthy T, et al (2003).** Emergence of *V. cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba from prevailing O1 ogawa serotype strains in India. J Clin Microbiol; 4249-53.
- 26. Hoai Thu Nguyen..., (2012),** Characterization of *Vibrio cholerae* O139 of an Aquatic Isolate in Northern Vietnam, The Open Microbiology Journal, 2012, Volume 6 .
- 27. Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., (2008).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature.406 (6795), 477-483.
- 28. Hodge CW, Bodhidatta L, Echeverria P (1996).** Epidemiologic Study of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Thailand: At the Advancing Edge of the Eighth Pandemic. Am J Epidemiol 1996; 143:263-268.
- 29. Huu Dat Tran , Munirul Alam, Nguyen Vu Trung, Nguyen Van Kinh, Hong Ha Nguyen, Van Ca Pham, Mohammad Ansaruzzaman, Shah Manzur Rashed, Nurul A. Bhuiyan, Tuyet Trinh Dao, Hubert P. Endtz, and Heiman F. L. Wertheim (2012)** Multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1 variant El Tor isolated in northern Vietnam between 2007 and 2010, Journal of Medical Microbiology (2012), 61, 431–437
- 30. Joao P.S. Cabral (2010).** International Journal of Environmental Research and Public Health, 7, 3657-3703; doi:10.3390/ijerph7103657, ISSN 1660-4601.
- 31. Jagdish Chander, Neelam Kaistha, Varsha Gupta, Manjula Mehta, Nidhi Singla, Antariksh Deep & B.L. Sarkar (2008).** Epidemiology

& antibiograms of *Vibrio cholerae* isolates from a tertiary care hospital in Chandigarh, north India

- 32. James Glanz; Denise Grady (12 September 2007).** "Cholera Epidemic Infects 7,000 People in Iraq". The New York Times. Retrieved 26 February 2011.
- 33. Kashmira Date (2012).** CDC Centers for Disease Control and Prevention.
- 34. Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., Bassler, B.L (2007).** Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell.110, 303-314.
- 35. McNeil Jr, Donald G. (9 January 2012).** "Haitian Cholera Epidemic Traced to First Known Victim". The New York Times.
- 36. M. Ehara, B.M.Nguyen, D.T.Nguyen, C.Toma, N.Higa, and M. Iwanaga (2004).** Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam
- 37. Nguyen BM, Higa N, Kakinohana S, Iwanaga M (2002).** Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Vietnam. Jpn J Trop Med Hyg 2002; 30: 103–107
- 38. N.Vijayalakshmi, R. S.rao and S.Badrinath (1997).** Minimum inhibitory concentration (MIC) of some antibiotics against *Vibrio cholerae* O139 isolates from Pondicherry.
- 39. Shukla Das, Rumpa Saha, Iqbal R. Kaur (2008).** Trend of antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* strains from East Delhi.
- 40. Smith D (2007-12-02).** "Cholera crisis hits Baghdad". The Observer (London). Retrieved 2010-02-01.

- 41. Sharma NC, Mandal PK, Dhillon R, Jain M (2007).** Changing profile of *Vibrio cholerae* O1, O139 in Delhi & its periphery (2003-2005). Indian J Med Res 2007; 125 : 633-40.
- 42. Taneja N, Kaur J, Sharma K, Singh M, Kalra JK, Sharma NM, (2003).** A recent outbreak of cholera due to *Vibrio cholerae* O1 Ogawa in & around Chandigarh, north India. Indian J Med Res 2003; 117 : 243-6. 117 : 243-6. 117
- 43. Tuan Cuong Ngo; Nguyen Dong Tu; Tran Huy Hoang; Le Thanh Huong; Nguyen Hoai Thu, Diep Tai The; Lan Nguyen Thi Phuong; Nguyen Binh Minh; Tran Nhu Duong; Yamashiro Tetsu; Morita Kouichi; Nguyen Tran Hien; Ehara Masahiko (2011).** Imported Dogs as Possible Vehicles of *Vibrio Cholerae* O1 Causing Cholera Outbreaks in Northern Vietnam.
- 44. Tomoyuki Nishibori, Garry Cores de Vries, Dadik Rahardjo, Eddy Bagus Wasito and Ro Osawa (2010).** Phenotypic and Genotypic Characterization of *Vibrio cholerae* Clinically Isolated in Surabaya, Indonesia.
- 45. Wong W, Ho YY (1998).** Imported cholera cases among tours returning from Thailand. Public Health & Epidemiology Bulletin. Department of Health, Hong Kong. 1998;7:21–4.

**KHÁC:**

- Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*, Centers for Disease Control and Prevention.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). COVIS Annual Summary, 2009. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
- Cholera Country Profile: Vietnam. WHO
- *Viện VSDTTU, 2010.* Phân biệt *V. cholerae* với *V. parahaemolyticus*

## CÁC TRANG WEB

<http://www.ykhoa.net.com>. chung vi khuẩn tả hiện nay ở nước ta có phải mọi xuất hiện-23/4/2008).

<http://www.fems.microbiology.org>. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host.

<http://www.voer.edu.vn/module/khoa-hoc-va-cong-nghe/sinh-hoc-phay-khuan-ta>

<http://vietsciences.free.fr> và <http://vietsciences.org> (Võ Văn Lượng, 8/2009).

<http://www.vovnews.vn/Home/Benh-ta-xuat-hien-tai-4-tinh-SCL/20106/147125.vov>  
(X.Thai translated, 2010)

<http://allafrica.com/stories/201210081462.html>

<http://tieu-chay-cap-tinh-va-benh-ta-dinh-danh>, Nguyễn Văn Tuấn, 2010)

<http://www.saigon-gpdaily.com.vn/Health/2010/6/83190/> (Mekong moves against use of cholerae-tainted river water by Phuong Nhu).

<http://www.sggp.org.vn/ytesuckhoe/2010/7/232012> (Dịch tả lan ra 6 tỉnh, thành ĐBSCL, Đ.Tuyên)..

[http://vi.wikipedia.org/wiki/Tra\\_Vinh](http://vi.wikipedia.org/wiki/Tra_Vinh).

<http://www.ninh-hoa.com/dacsan-2008/DS2008>

<http://360.carehub.vn/suc-khoe-a-z/benh-a-z/13011>