

Chương 37. *Brucella*

Nội dung

37.1.	Giới thiệu	3
37.2.	Phân loại <i>Brucella</i>	3
37.3.	Đặc điểm vi khuẩn	3
37.3.1.	Hình thái	3
37.3.2.	Thành phần thành tế bào và cấu trúc kháng nguyên	4
37.3.3.	Nuôi cấy	4
37.3.4.	Đặc điểm sinh hóa	5
37.3.5.	Kiểu sinh học	6
37.3.6.	Kiểu phage	6
37.3.7.	Các đặc điểm khác	6
37.4.	Đặc điểm gây bệnh	7
37.4.1.	Yếu tố gây bệnh	8
37.4.2.	Phát sinh bệnh do <i>Brucella</i>	8
37.5.	Miễn dịch của cơ thể chủ	12
37.6.	Dịch tễ học	13
37.6.1.	Phân bố về địa lý	13
37.6.2.	Môi trường sống	13
37.6.3.	Nguồn lan truyền bệnh	13
37.7.	Phát hiện tại phòng thí nghiệm	14
37.7.1.	Mẫu thử	14
37.7.2.	Kỹ thuật phân tích	15
37.7.3.	Soi dưới kính hiển vi	16
37.7.4.	Môi trường nuôi cấy	16
37.7.5.	Nuôi cấy	19
37.7.6.	Xác định vi khuẩn	20

37.7.7. Định danh và phân kiểu.....	21
37.7.8. Chẩn đoán bằng huyết thanh	22
37.7.9. Phương pháp phân tử	25
37.7.10. Thử nghiệm khác	25
37.7.11. Phát hiện bệnh ở động vật tại phòng thí nghiệm	26
37.8. Điều trị	26
37.9. Ngăn chặn và kiểm soát.....	27

37.1. Giới thiệu

Giống *Brucella* là cầu trực khuẩn hiếu khí, Gram âm, có kích thước nhỏ, không lên men, không di động, không hình thành bào tử, không tạo độc tố. Vi khuẩn này có thể phát triển trên nhiều môi trường nuôi cấy khác nhau, gồm: dextrose huyết thanh, thạch máu và thạch chocolate. *Brucella* là những vi khuẩn ký sinh chặt chẽ với động vật hoang dã và động vật thuần dưỡng nhưng chúng cũng có thể nhiễm vào người.

Bệnh do *Brucella* gây ra chủ yếu lan truyền qua đường động vật do *Brucella* nhiễm vào động vật thuần dưỡng. Bệnh do *Brucella* là vấn đề lớn, liên tục gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Bệnh này được gọi bằng nhiều tên khác nhau như sốt Malta, sốt Địa Trung Hải,

37.2. Phân loại *Brucella*

Giống *Brucella* gồm bảy loài, trong đó có bốn loài gây bệnh cho người gồm *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* và *Brucella canis*. Bệnh ở người do *Brucella neotomae* và *Brucella ovis* đã được mô tả. Hơn nữa mỗi loài *Brucella* có đặc điểm ưa thích đặc trưng để nhiễm vào một số loài động vật nơi mà chúng gây bệnh mạn tính, tồn tại dai dẳng. Chi tiết các loài gây bệnh ở người được tóm tắt ở Bảng 37.1.

Bảng 37.1. Bệnh ở người do các loài vi khuẩn *Brucella*.

Vi khuẩn	Bệnh
<i>Brucella abortus</i>	Bệnh do brucella dạng nhẹ, hiếm khi biến chứng mưng mủ
<i>Brucella melitensis</i>	Bệnh cấp tính do brucella gây ra cùng với đó là nhiều biến chứng
<i>Brucella suis</i>	Bệnh mạn tính do brucella cùng với đó là các biến chứng mưng mủ
<i>Brucella canis</i>	Bệnh do brucella dạng nhẹ, hiếm khi biến chứng mưng mủ

37.3. Đặc điểm vi khuẩn**37.3.1. Hình thái**

Brucella biểu hiện các đặc điểm hình thái sau:

- (1). Là vi khuẩn Gram âm nhưng phản ánh chất nhuộm kém và cần có thời gian để nhuộm.
- (2). Là cầu trực khuẩn nhỏ, kích thước từ 0,5 - 0,7 x 0,6 - 1,5 μm .
- (3). Khuẩn này sắp xếp ở dạng tế bào đơn, đôi khi là dạng đôi hay dạng chuỗi

ngắn.

(4). *Brucella* không hình thành bào tử, không có tiên mao hay capsule.

37.3.2. Thành phần thành tế bào và cấu trúc kháng nguyên

Giống như vi khuẩn Gram âm khác, *Brucella* có LPS ở màng ngoài tế bào. Nhưng LPS của *Brucella* có cấu trúc và chức năng khác với LPS của vi khuẩn Gram âm khác. LPS của *Brucella* biểu hiện các đặc tính độc đáo sau:

(1). Phần lipid A của LPS có chuỗi acid béo dài 16 carbon nhưng lại thiếu myristic acid dài 14 carbon điển hình của lipid A thường có trong các vi khuẩn thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*.

(2). Phần polysaccharide O của LPS có chức năng khác thường đó là 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranoside, chất này được biểu hiện hoặc là polymer đồng dạng (homopolymer) của các đường type A có liên kết α -1,2 hoặc là đường type M có liên kết 3- α -1,2- và 2- α -1,3. Về cơ bản các liên kết polysaccharide O này, còn gọi kháng nguyên thân của *Brucella* được phân thành hai nhóm chính: kháng nguyên A và kháng nguyên M.

B. abortus có nồng độ kháng nguyên A cao nhất, gấp 20 lần so với kháng nguyên M, trong khi đó *B. melitensis* có nồng độ kháng nguyên M cao nhất, gấp 20 lần so với kháng nguyên A. *B. suis* có kiểu kháng nguyên trung bình.

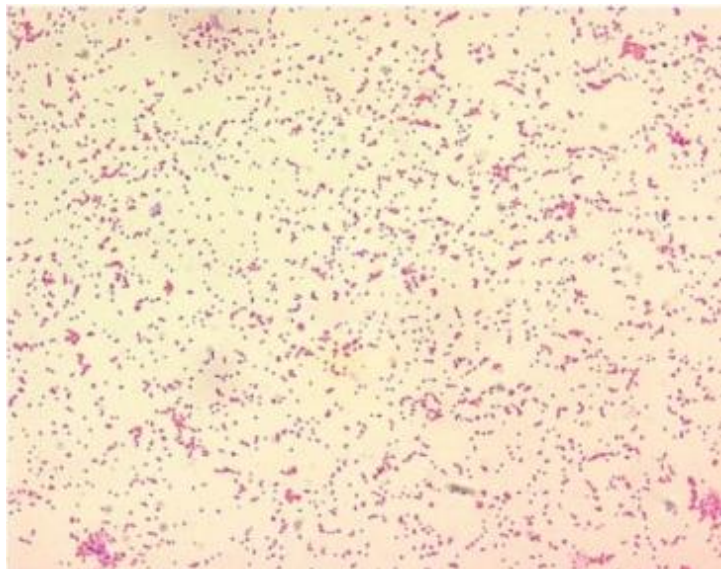
Các loài *Brucella* biểu hiện phản ứng chéo về kháng nguyên với *Salmonella* kiểu huyết thanh N (kháng nguyên O: 30), *Escherichia coli* (O: 116, O: 157), *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas multocida*, *Yersinia enterocolitica* và *Francisella tularensis*.

Ngưng kết và đặc điểm khác của các loài *Brucella* được tóm tắt ở Bảng 37.2.

37.3.3. Nuôi cấy

Brucellae là vi khuẩn hiếu khí nghiêm ngặt. Hầu hết các biến thể sinh học của *B. abortus* đòi hỏi có 5 - 10% CO₂ để tăng trưởng. Trong điều kiện kỵ khí, khuẩn này không tăng trưởng được. Nhiệt độ cần thiết để chúng tăng trưởng trong khoảng từ 22 - 40°C, tối thích ở 37°C và ở khoảng pH từ 6,6 - 7,4. *Brucella* có thể tăng trưởng chậm trên môi trường đơn giản. Sự tăng trưởng của chúng được cải thiện khi có thêm huyết thanh, máu, chiết xuất từ gan và glucose vào môi trường. *Brucella* tăng trưởng tốt nhất trên môi

trường trypticase soy hay các môi trường làm giàu khác. Môi trường thạch máu và môi trường thạch trypticase soy là những môi trường được lựa chọn. Môi trường thạch tryptose, thạch trypticase soy, môi trường thạch huyết thanh có nước chiết khoai tây và môi trường thạch huyết thanh có dextrose là những môi trường khác được sử dụng để nuôi cấy Brucellae. Các môi trường này trở thành môi trường chọn lọc khi thêm kháng sinh bacitracin, polymyxin và cycloheximide. Trên các môi trường rắn này, *Brucella* spp.



tạo khuẩn lạc nhỏ, ẩm ướt và sáng lấp lánh sau 3 ngày ủ hoặc thời gian ủ nhiều hơn (Hình 37.1). Trong môi trường lỏng chúng tăng trưởng đồng dạng.

Hình 37.1. Ảnh nhuộm Gram của *Brucella* spp. cho thấy khuẩn này ăn chất nhuộm kém. *Brucella* là cầu trực khuẩn Gram âm có kích thước 0,5 - 0,7 x 0,6 - 1,5 μ m và

hầu như ở dạng tế bào đơn trông giống như cát mịn (CDC).

37.3.4. Đặc điểm sinh hóa

Các loài *Brucella* có những đặc điểm sinh hóa sau:

(1). *Brucella* có catalase và oxidase dương ngoại trừ *B. ovis* và *B. neotomae* có oxidase âm.

(2). Chúng có khả năng khử nitrate thành nitrite và có hoạt tính urease dao động: *B. suis* có phản ứng urease dương trong 30 phút, trong khi đó *B. abortus* có phản ứng urease dương trong 1 - 2 giờ.

(3). Một số loài *Brucella* tạo H_2S , ngược lại một số loài thì không.

(4). *Brucella* không có khả năng sử dụng citrate.

(5). Khuẩn này không sinh indole và có MR và VP âm.

(6). *Brucella* không lên men bất kỳ chất đường nào.

Các loài *Brucella* và biến thể sinh học của chúng có những đặc điểm khác nhau

như sau: (a) tăng trưởng khi có sự hiện diện của chất màu aniline như fuchsin hay thionine; (b) đòi hỏi CO₂ để tăng trưởng; (c) có khả năng sử dụng glutamic acid, ornithine, lysine và ribose; (d) có khả năng tạo H₂S; (e) ngưng kết với huyết thanh kháng chống lại lipopolysaccharide chuyên biệt và (f) nhạy cảm với sự phân giải của thực khuẩn thể.



Hình 37.2. Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn Brucella trên môi trường (a). Thạch chocolate trong 72 giờ ở 37°C; (b). Trên môi trường thạch máu trypticase soy trong 48 giờ, Brucella hình thành khuẩn lạc có hình dạng trong giống như đinh ghim, nhẵn, trong mờ, không tiêu huyết (CDC).

37.3.5. Kiểu sinh học

Loài *B. abortus* có bảy kiểu sinh học (biotype), loài *B. melitensis* có ba kiểu sinh học và *B. suis* có năm kiểu sinh học. Các chủng *B. suis* tạo H₂S gọi là chủng Mỹ và các chủng không tạo H₂S được gọi là chủng Đan Mạch.

37.3.6. Kiểu phage

Tblisi (Tb) là phage đối chứng được sử dụng để phân kiểu phage các loài *Brucella*. Kiểu phage này làm tan *B. abortus* ở cả nồng độ pha loãng thử nghiệm thường quy (RTD) và ở 10.000 RTD. Phage này chỉ làm tan *B. suis* ở 10.000 RTD nhưng lại không làm tan bất kỳ chủng nào của *B. melitensis*.

37.3.7. Các đặc điểm khác

Brucellae dễ dàng bị tiêu diệt nhanh chóng ở 60 °C trong 10 phút; vì vậy sử dụng kỹ thuật thanh trùng pasteur sẽ tiêu diệt hoàn toàn vi khuẩn này nếu chúng có trong sữa.

Chương 37. Brucella

Khuẩn này cũng bị chất khử trùng phenol 1% tiêu diệt trong 15 phút. Chúng cũng nhạy cảm với ánh sáng trực tiếp và acid. Brucellae sống sót 10 ngày ở sữa giữ lạnh, 1 tháng trong kem và 4 tháng trong bơ. *B. melitensis* tồn tại trong nước tiểu 6 ngày, 6 tuần trong bụi và 10 tuần trong nước hay đất.

Bảng 37.2. Ngưng kết và các đặc điểm khác của *Brucella*.

Loài	Kiểu sinh học	Ngưng kết do huyết thanh			Ly giải do phage	
		A	M	R	RTD	10.000
<i>Brucella melitensis</i>	1	-	+	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
<i>Brucella abortus</i>	1	+	-	-	+	+
	2	+	-	-	+	+
	3	+	-	-	+	+
	4	-	+	-	+	+
	5	-	+	-	+	+
	6	+	-	-	+	+
	9	-	+	-	+	+
<i>Brucella suis</i>	1	+	-	-	-	+
	2	+	-	-	-	+
	3	+	-	-	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	-	+	-	-	+
<i>Brucella canis</i>		-	-	+	-	-
<i>Brucella ovis</i>		-	-	+	-	-
<i>Brucella neotomae</i>		+	-	-	-	+

37.4. Đặc điểm gây bệnh

Brucella spp. thích ứng tăng trưởng trong nội bào. Chúng đã được chứng minh tăng trưởng bên trong thực bào. Vị trí bên trong nội bào của *Brucella* giúp lý giải khả năng *Brucella* kháng tương đối với liệu pháp hoá học.

37.4.1. Yếu tố gây bệnh

LPS là yếu tố gây bệnh chính của *Brucella* spp. Vị trí nội bào của vi khuẩn giúp chúng kháng được khả năng tiêu diệt của huyết thanh và thực bào (Bảng 37.3).

Bảng 37.3. Yếu tố gây bệnh của *Brucella* sp.

Yếu tố gây bệnh	Chức năng sinh học
LPS	Tạo thuận lợi cho vi khuẩn sống sót bên trong nội bào nhờ ức chế khả năng làm mất hạt của bạch cầu đa nhân
Vị trí nội bào của vi khuẩn	Làm cho vi khuẩn kháng lại sự tiêu diệt ở huyết thanh và của thực bào.

37.4.2. Phát sinh bệnh do Brucella

(1). Bệnh do *Brucella* gây ra ở gia súc: bệnh do *Brucella* ở gia súc thường do các biến thể sinh học (biovar) của *Brucella abortus* gây ra. Ở một số quốc gia như Nam Âu, Châu Phi và Tây Á, nơi mà gia súc được nhốt chung với cừu và dê, thì bệnh cũng có thể do *B. melitensis* gây ra. Đôi khi *B. suis* có thể gây bệnh tuyến vú mạn tính ở gia súc nhưng lại không gây sẩy thai hay lây lan bệnh cho động vật khác. Bệnh do *Brucella* ở gia súc phân bố rộng khắp trên toàn cầu nhưng một số nước như Bắc và Trung Âu, Canada, Nhật Bản, Úc và New Zealand được cho là không có *B. abortus* và *B. melitensis*.

Bệnh thường không biểu hiện rõ ràng ở động vật còn nhỏ và ở giống cái chưa mang thai. Sau khi nhiễm *B. abortus* hay *B. melitensis*, con cái mang thai phát triển chứng viêm thai, thường dẫn đến sẩy thai giữa tháng thứ năm và tháng thứ chín của thai kỳ. Ngay cả khi không có sẩy thai, một lượng lớn chất tiết có vi khuẩn xuất hiện trong nhau thai, dịch thai và dịch âm đạo (còn gọi là khí hư). Tuyến vú và hạch bạch huyết có liên quan cũng có thể bị nhiễm và vi khuẩn có thể được tiết vào trong sữa. Thời kỳ mang thai thường kết thúc nhưng viêm nhiễm tử cung và tuyến vú vẫn còn, lượng vi khuẩn trong sản phẩm sữa giảm đi sau khi sinh. Ở giai đoạn viêm nhiễm cấp tính, vi khuẩn hiện diện trong hầu hết các hạch bạch huyết chính của cơ thể. Gia súc đực trưởng thành có thể phát triển chứng viêm tinh hoàn (orchitis)/ viêm mào tinh hoàn (epididymitis) và bệnh do brucella. Nang dịch (hygroma) thường liên quan đến khớp nối ở chân, là những biểu hiện phổ biến nhất của bệnh do brucella ở một số xứ sở nhiệt đới và có thể chỉ là biểu hiện

trước khi bệnh xảy ra; nang thanh dịch thường bị nhiễm *Brucella*.

(2). Bệnh do *Brucella* gây ra ở cừu và dê: bệnh do *Brucella* gây ra ở cừu và dê (không bao gồm bệnh do *B. ovis*) chủ yếu tập trung vào một trong ba biến thể sinh học của *B. melitensis*. Nhiễm trùng ở cừu và dê do *B. abortus* hay *B. suis* gây ra thường không thường xuyên và những trường hợp xuất hiện bệnh như vậy cực kỳ hiếm. Bệnh do *Brucella* ở cừu và dê thường là dịch bệnh cục bộ/địa phương (endemic) ở vùng Địa Trung Hải nhưng bệnh có khi lại lan rộng ra toàn thế giới. Bắc Mỹ được cho là không có yếu tố gây bệnh này, trong khi Bắc và Trung Âu, Đông Nam Á, Úc và New Zealand lại có. Bệnh lý và dịch tễ học của bệnh do *B. melitensis* ở cừu và dê thì rất giống với bệnh lý và dịch tễ học bệnh do *B. abortus* gây ra ở gia súc. Trong hầu hết các trường hợp, bệnh chủ yếu lan truyền qua nhau thai, dịch thai và dịch âm đạo (khí hư), *Brucella* được thải ra từ cừu và dê cái bị nhiễm khi chúng bị sảy thai hay sinh đủ tháng. *Brucella* cũng thường được thải ra từ dịch tiết của vú, tinh dịch và chúng có thể phân lập được từ các mô này như hạch bạch huyết, lá lách và các cơ quan có liên quan đến sinh sản như tử cung, mào tinh hoàn và tinh hoàn cũng như từ bệnh viêm khớp.

(3). Bệnh do *Brucella* gây ra ở heo: bệnh do *Brucella* gây ra ở heo chủ yếu do kiểu sinh học 1, 2 hay 3 của *B. suis*. Cũng có thể có trường hợp bệnh do *B. abortus* hay *B. melitensis* gây ra ở heo nhưng các trường hợp như vậy rất hiếm. Bệnh xuất hiện ở nhiều nước có nghề nuôi heo. Nhìn chung mức độ phổ biến thì thấp nhưng ở một số quốc gia như Nam Mỹ và Đông Nam Á, mức độ phổ biến của bệnh này có thể cao hơn. Bệnh brucella ở heo có thể là nghiêm trọng nhưng hiện nay một số quốc gia chưa được công nhận vấn đề này. Bệnh do kiểu sinh học 1 của *Brucella suis* được phát hiện trong heo hoang dã ở một số ban miền nam Hoa Kỳ và ở bang Queensland (Úc) và ở một số quốc gia khác thuộc Châu Đại Dương (Oceania). Ở các quốc gia này, nhiều người săn bắn và tiếp xúc với heo hoang dã đã bị bệnh. Bệnh này chủ yếu lan truyền là do sử dụng sản phẩm thai hay sảy thai và khí hư bị nhiễm làm thức ăn cho động vật. Heo dễ dàng ăn phải nhau thai sảy thai và màng nhau thai. Lan truyền do giao phối cũng thường xảy ra và việc tiết *B. suis* trong tinh dịch đã gợi ý cho việc thực hành thụ tinh nhân tạo. Ở heo, giống như động vật nhai lại, sau khi khởi đầu nhiễm trùng huyết, *B. suis* tập kết trong các tế bào

thuộc tuyến sinh sản của động vật. Ở con cái, nhau thai và thai bị vi khuẩn xâm lấn, ngược lại ở con đực, vi khuẩn xâm lấn ở một hoặc nhiều vị trí sau: tinh hoàn, tuyến tiền liệt, mào tinh hoàn, túi tinh hay tuyến hành - niệu quản. Ở các tổn thương của con đực, hầu hết là về một phía, bắt đầu là sự tăng sản có thể tiến triển hình thành áp se; cuối giai đoạn bệnh xuất hiện đặc trưng xơ cứng và teo lại. Viêm khớp có thể xảy ra ở nhiều khớp nối và đôi khi cũng xuất hiện viêm đốt sống. Biểu hiện phổ biến nhất của bệnh do brucella xảy ra ở heo cái là sảy thai, xuất hiện bất kỳ thời điểm nào trong thời gian mang thai, nhưng thường phổ biến nhất giữa thời điểm ngày thứ 50 và 110 thai kỳ. Dịch âm đạo thường không phải là bằng chứng và những đàn nhiễm mạn tính thường là vô sinh hơn là sảy thai là những dấu hiệu thường có liên quan nhất của bệnh này. Ở con đực, bệnh do brucella gây ra thường dai dẳng, có các tổn thương ở tuyến sinh dục nên thường làm cản trở hoạt động sinh dục, điều này có thể tạm thời hoặc lâu dài. Heo đực có thể tiết *Brucella* trong tinh dịch mà không có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào ở các cơ quan sinh dục hay làm ảnh hưởng đến hoạt động sinh dục. Ở cả con đực và cái, có thể có các khớp và bao gân phồng lên, làm chúng đi khắp khiêng và đôi khi là liệt phía sau. Một tỷ lệ đáng kể cả heo đực và cái sẽ phục hồi khỏi bệnh, thường là trong vòng 6 tháng nhưng tỷ lệ nhiều hơn vẫn bị nhiễm dai dẳng hơn.

Bệnh do *B. suis* bv. 2 thì khác với bệnh do bv. 1 và bv. 3 ở động vật chủ mà chúng xâm nhiễm, phân bố và tính phát sinh bệnh. Về mặt lịch sử, sự phân bố về địa lý của *B. suis* bv. 2 thì trải dài rộng khắp giữa các nước thuộc Scandinavia và Balkan. Mức độ phổ biến của vi khuẩn này thì cao ở heo đực hoang dã trên khắp lục địa Châu Âu (EFSA, 2009). Trong các vụ bùng nổ ở Châu Âu, heo đực hoang dã thường được xem là nguồn lan truyền bệnh. *Brucella suis* bv. 2 gây các tổn thương như hạt kê (có hạt nhỏ li ti), nhất là ở các mô sinh sản, thường có mủ. Ngày nay hiếm khi có các báo cáo về bv. 2 là nguyên nhân gây bệnh do brucella cho người. Tuy nhiên bệnh do bv. 2 đã được báo cáo ở những thợ săn bị suy giảm miễn dịch, người thường xuyên tiếp xúc với công việc như loại bỏ nội tạng hay lạng da heo đực hoặc thỏ rừng. Hơn nữa các trường hợp hiếm bệnh gặp do *B. suis* bv. 2 xâm nhiễm không có dấu hiệu lâm sàng đã được báo cáo xảy ra ở gia súc hoặc cừu thuộc Châu Âu bị phơi nhiễm với heo đực hoang dã (EFSA, 2009).

Bệnh do Brucella bệnh toàn thân ở người có thể liên quan đến hầu hết hệ cơ quan. Khuẩn này có thể xâm nhập qua (a) vết trầy xước hoặc vết cắt của da, (b) qua kết mạc, (c) đường hô hấp và (d) tuyến dạ dày ruột. Ngay sau khi xâm nhập vào cơ thể, brucella nhanh chóng bị bạch cầu đa nhân tiêu hoá, bạch cầu này được dẫn dụ đến vị trí viêm. Tuy nhiên bên trong các bạch cầu này, brucella không bị tiêu diệt nhờ sự hiện diện của enzyme superoxide dismutase, polysaccharide O của LPS và các chất như nucleotide từ vi khuẩn. Brucella sống sót do thoát khỏi sự tiêu diệt của leukocyte, sẽ lan ra từ vị trí xâm nhiễm đến các hạch bạch huyết cục bộ. Bên trong tuyến bạch huyết, vi khuẩn nhân lên và phóng thích vào máu sau khi làm thủng tế bào và được các đại thực bào tiến hành thực bào.

Vi khuẩn hiện diện trong các đại thực bào sau đó được mang tới các cơ quan của hệ lưới nội mô như gan, lá lách, tuỷ xương, hạch bạch huyết và thận. Trong những cơ quan này, brucella nhân lên trong thể thực bào (phagosome) của các đại thực bào là nhờ có sự sản sinh ra adenine và guanine monophosphate, các chất này ức chế sự dung hợp của thể thực bào sinh tan (phagolysosome), hoạt tính ứng kích oxi hoá (oxidative burst) và sản sinh ra yếu tố gây hoại tử khối u (TNF).

Ngoài ra các cơ quan của hệ lưới nội chất hay bất kỳ hệ cơ quan nào khác như hệ thần kinh trung ương, tim, khớp nối, hệ niệu dục, hệ phổi và da có thể có liên quan với bệnh do brucella.

(4). Bệnh do brucella gây ra ở người: biểu hiện lâm sàng của bệnh do brucella gây ra ở người thì thay đổi, phụ thuộc vào loài *Brucella* xâm nhiễm. Trong bốn loài *Brucella* gây bệnh ở người thì *B. melitensis* là loài độc nhất. Loài này gây ra hầu hết các trường hợp cấp tính và nghiêm trọng nhất của bệnh do brucella. Đây cũng là loài phổ biến nhất gây bệnh brucella. Do *B. melitensis* có thể sống sót và nhân lên trong các tế bào thực bào vì vậy khuẩn này sản sinh ra một lượng lớn tế bào.

B. suis liên quan đến việc kéo dài thời gian gây bệnh cùng với đó là chứng mủ, tổn thương do phá huỷ. *B. abortus* gây bệnh rời rạc từ nhẹ đến vừa và hiếm khi gây các biến chứng. *B. canis* thường tấn công âm i, tái phát nhiều lần và không gây bệnh mạn tính.

Thời gian ủ bệnh từ 3 ngày đến một số tuần. Bệnh do brucella ở người có thể có ba kiểu như sau: (a) bệnh cấp tính do brucella, (b) bệnh mạn tính do brucella và (c) nhiễm trùng cục bộ.

(a). Bệnh cấp tính do brucella: chiếm khoảng 50% bệnh nhân bị nhiễm *Brucella*. Các bệnh nhân bị bệnh do brucella thường phản ánh các triệu chứng không đặc trưng như biếng ăn, mệt mỏi, cảm giác cơ thể yếu, khó chịu hay đau khớp. Sốt là triệu chứng quan trọng và được phát hiện ở tất cả các bệnh nhân. Sốt từng cơn và sốt đặc trưng do brucella và có thể liên quan đến nhịp tim chậm tương đối. Ở những bệnh nhân bị bệnh có thể biểu hiện các triệu chứng về đường hô hấp (20%), triệu chứng về xương và khớp nối (20 - 60%), triệu chứng về thần kinh - tâm thần học (neuropsychiatric symptom) và các triệu chứng về tuyến dạ dày ruột.

(b). Bệnh mạn tính do brucella: bệnh phát triển ở các bệnh nhân không được điều trị dứt điểm. Bệnh mạn tính thường liên quan đến sự nhiễm trùng ở mức thấp không gây đủ khuẩn huyết (bacteremia) cùng với đó là sự bùng nổ định kỳ của động vật. Các triệu chứng thường kéo dài trong vòng 3 - 6 tháng và đôi khi kéo dài cả năm hoặc nhiều hơn.

(c). Nhiễm trùng cục bộ: *B. suis* thường gây nhiễm trùng cục bộ và và nhiễm trùng mưng mủ. Các biến chứng gồm nhiễm trùng tim, hệ thần kinh trung ương (CNS) và da. Viêm nội mạc tâm do brucella là biến chứng nguy hiểm nhất và làm cho 80% bệnh nhân chết do bị bệnh brucella gây ra. Viêm não và màng não mạn tính là biểu hiện thường gặp của nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương.

37.5. Miễn dịch của cơ thể chủ

Giống như các vi khuẩn gây bệnh nội bào bắt buộc khác, sự miễn dịch ở bệnh do brucella chủ yếu là miễn dịch qua trung gian tế bào. Các đại thực bào được hoạt hoá chủ yếu dùng để tiêu diệt vi khuẩn nhờ sản sinh ra gamma interferon và các cytokine khác. Có ý kiến cho rằng: kháng thể, bổ thể và các cytokine hoạt hoá đại thực bào cũng có vai trò hỗ trợ trong việc kiểm soát sự nhân lên của vi khuẩn ngoại bào hoặc sự gây bệnh sớm. Miễn dịch dịch thể đặc trưng nhờ sự sản sinh các kháng thể chống lại LPS của vi khuẩn. Tuy nhiên ngay cả khi sự hiện diện của hoạt tính opsonin, kháng thể huyết thanh này

chống lại LPS không cung cấp bất kỳ miễn dịch bảo vệ nào chống lại vi khuẩn.

37.6. Dịch tễ học

37.6.1. Phân bố về địa lý

Bệnh do *Brucella* phân bố khắp nơi trên thế giới. Bệnh này gây dịch bùng phát cục bộ ở một số quốc gia thuộc Địa trung hải. Có hơn 500.000 trường hợp bệnh do brucella được báo cáo hàng năm. Các loài *Brucella* khác nhau gây bệnh ở người ở những vùng địa lý khác nhau. *B. melitensis* là loài chủ yếu gây bệnh cho người ở Ấn độ. Ở Hoa Kỳ, *B. suis* là loài chủ yếu gây bệnh, ngược lại ở Anh Quốc, *B. abortus* là loài gây bệnh quan trọng nhất.

37.6.2. Môi trường sống

Brucella species là vi khuẩn gây bệnh chủ yếu sống bên trong nội bào của hệ lưới nội mô như hạch bạch huyết, gan, lá lách và tuỷ xương.

37.6.3. Nguồn lan truyền bệnh

Brucella sp. gây bệnh cho nhiều loại vật chủ nhưng các loài này biểu hiện mức độ cao về tính đặc hiệu của vật chủ. *B. melitensis* nhiễm vào dê và cừu; *B. abortus* nhiễm vào gia súc; *B. suis* nhiễm vào heo và *B. canis* nhiễm vào chó và cáo. Các động vật bị nhiễm như cừu, dê, cừu, trâu và heo là nguồn chứa quan trọng cho sự xâm nhiễm. Tỷ lệ mắc phải bệnh ở người rất gần với sự phổ biến của bệnh xảy ở gia súc dê và cừu. Điều này là do các hoạt động của người tiếp xúc với động vật bị nhiễm hay sản phẩm của động vật có nhiễm vi khuẩn.

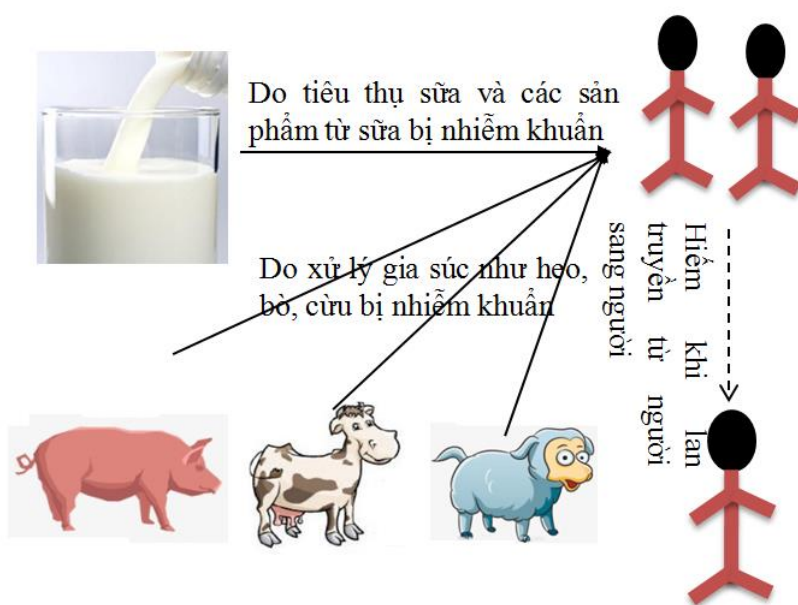
Bệnh ở người do brucella chủ yếu là bệnh truyền qua động vật. Bệnh luôn mắc phải từ động vật một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Khuẩn *Brucella* được truyền vào người theo cách: (1) nuốt vào, (2) tiếp xúc trực tiếp, (3) hít vào và (4) cấy vào do ngẫu nhiên (Hình 37.3).

(1). Nuốt vào: bệnh do brucella chủ yếu là do uống sữa bị nhiễm không qua thanh trùng pasteur hay sản phẩm sữa bị nhiễm khuẩn. Bệnh cũng có thể được truyền do uống nước bị nhiễm hoặc ăn rau sống bị nhiễm phân hoặc nước tiểu của động vật bị nhiễm hoặc cũng có thể do ăn thịt động vật bị nhiễm.

(2). Tiếp xúc trực tiếp: bệnh mắc phải do tiếp xúc trực tiếp với vật liệu bị nhiễm

từ nguồn động vật sảy thai do khuẩn này hay tại thời điểm giết mổ động vật. *Brucella* species hiện diện trong vật liệu bị nhiễm như nhau thai, thai, dịch tiết âm đạo, nước tiểu hay xác động vật bị nhiễm. Theo đó chúng xâm nhập vào người qua niêm mạc, kết mạc hay da.

(3). Hít vào: bệnh được lan truyền do hít vào bụi từ lông hay vật liệu khô của động vật bị nhiễm. Những người có nguy cơ nhiễm qua đường hô hấp là bác sỹ thú y và nhân viên phòng thí nghiệm.



(4). Cây vào do ngẫu nhiên: cây vào do ngẫu nhiên là nguy cơ quan trọng ở các nhân viên phòng thí nghiệm người luôn thao tác cấy vi khuẩn.

Hình 37.3. Sơ đồ minh họa cách thức lan truyền vi khuẩn gây bệnh *Brucella* vào người.

37.7. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

Chẩn đoán lâm sàng bệnh do brucella thì rất khó khăn do bệnh có biểu hiện thay đổi. Vì vậy việc chẩn đoán, phát hiện tại phòng thí nghiệm đóng vai trò quan trọng trong việc khẳng định bệnh do brucella.

Việc phân lập vi khuẩn này thì mất nhiều thời gian, tốn kém và công kênh nhưng vẫn phải thực hiện bất cứ khi nào cần khẳng định bệnh và cần xác định loài/kiểu sinh học *Brucella* có liên quan. Mặc dù không cần phải xem xét về độ nhạy nhưng điều đó có thể rất hiệu quả khi loại và số lượng mẫu, bảo quản đúng, môi trường sử dụng cần phải được tối thích.

37.7.1. Mẫu thử

Để chẩn đoán bệnh do brucella ở động vật bằng xét nghiệm nuôi cấy, việc lựa chọn mẫu thường phụ thuộc vào dấu hiệu lâm sàng quan sát được. Mẫu có giá trị nhất

gồm chất tiết âm đạo (sử dụng kỹ thuật phết swab); nhau thai sấy gồm thành phần dạ dày, lách và phổi; màng thai; sữa, tinh dịch; dịch viêm khớp hay dịch hygroma. Đối với xác động vật, mô thích hợp nhất cho nuôi cấy là những mô thuộc hệ lưới nội mô ví dụ đầu, tuyến vú và hạch bạch huyết sinh dục và lách, người mang thai hay dạ con sau khi đẻ sớm và vú. Vi khuẩn tăng trưởng thường xuất hiện sau 3 - 4 ngày nhưng kết quả không được kết luận là âm tính trước 7 - 10 ngày nuôi ủ.

Mẫu được lấy bằng thiết bị vô trùng. Mẫu mô cần loại bỏ phần ở ngoài ví dụ như mỡ, cắt thành những miếng nhỏ và một lượng mẫu cho vào bao PBS vô trùng, đồng nhất bằng máy đập mẫu hay thiết bị nghiền mẫu, trước khi cấy vào môi trường rắn.

Phết âm đạo được lấy sau khi động vật đã xảy thai hay sinh non là nguồn mẫu tuyệt vời để phát hiện brucella và ít rủi ro cho người thao tác hơn so với vật liệu sấy thai. Mẫu phết sau đó được cấy trực tiếp lên môi trường rắn.

Mẫu sữa phải được thu thập ngay sau khi vú được rửa sạch, làm khô và khử trùng. Nếu brucella có trong sữa thì số lượng của chúng thường thấp và việc phân lập chúng từ các mẫu như vậy không phải dễ dàng. Các sản phẩm sữa như pho mai cần được tăng sinh trên môi trường làm giàu do chúng chỉ có một lượng ít vi khuẩn. Mẫu cần phải được đồng nhất cẩn thận trước khi nuôi cấy bằng các thiết bị hỗ trợ như máy xay mẫu, máy đập mẫu,

Máu là mẫu thử cũng được lựa chọn và được thu thập để nuôi cấy và thử nghiệm huyết thanh. Tuỷ xương và đôi khi hoạt dịch (synovial fluid) và dịch màng phổi cũng được thu thập để nuôi cấy. Mẫu thử như gan và hạch bạch huyết cũng được nuôi cấy để phân lập *Brucella*. Hiếm khi phân lập được vi khuẩn này từ dịch não tuỷ (CSF), nước tiểu, đờm, sữa, dịch âm đạo và tinh dịch.

37.7.2. Kỹ thuật phân tích

Brucella là cầu trực khuẩn hay hình que ngắn, kích thước 0,6 - 1,5 μm x 0,5 - 0,7 μm . Chúng thường sắp xếp ở dạng đơn và thường ít hơn ở dạng đôi hay nhóm nhỏ. Hình dạng của *Brucella* tương đối ổn định, ngoại trừ các chủng nuôi cấy lâu có sự thay đổi về hình dạng. *Brucella* không di động, không hình thành bào tử và không có tiên mao, sợi tơ hay capsule. *Brucella* là vi khuẩn Gram âm và thường không biểu hiện đặc tính ăn chất

màu ở hai đầu cực (bipolar staining). Chúng có khả năng kháng được sự mất màu do acid yếu và ăn chất nhuộm màu đỏ khi nhuộm Stamp. Vì vậy nhuộm Stamp là kỹ thuật nhuộm cải biên từ phương pháp Ziehl - Neelsen được sử dụng để nhuộm vi khuẩn này. Khi sử dụng phương pháp này, vi khuẩn hay dịch sinh học được trải trên lam kính trước khi cố định bằng nhiệt hay ethanol, *Brucella* ăn chất nhuộm màu đỏ trái ngược với nền có màu xanh. Kỹ thuật dựa trên liên kết kháng thể gắn fluorochrome hay peroxidase cũng có thể được sử dụng. Khi có mặt vi khuẩn bên trong nội bào, có acid-fast yếu hay vi khuẩn ăn chất nhuộm miễn dịch đặc hiệu là bằng chứng giả định về bệnh do brucella. Tuy nhiên, các phương pháp này thì không dễ thực hành, có độ nhạy thấp đối với mẫu sữa và sản phẩm từ sữa là những sản phẩm mà *Brucella* thường hiện diện với số lượng nhỏ và độc kết quả thường bị cản trở do sự hiện diện của các giọt mỡ. Cần phải cẩn thận cũng như đưa ra kết luận kết quả dương theo phương pháp nhuộm Stamp bởi vì có thể dễ dàng nhầm lẫn với các vi sinh vật khác gây sẩy thai ví dụ như *Chlamydia abortus* hay *Coxiella burnetii*. Vì vậy bất cứ kết quả dương tính hay âm tính đều phải khẳng định bằng nuôi cấy.

Phương pháp mẫu dò trực tiếp DNA hay PCR cũng có thể được sử dụng để chứng minh vi khuẩn trong nhiều mẫu sinh học, nhưng hiện nay độ nhạy và độ đặc hiệu của những cách tiếp cận này vẫn còn thấp so với phương pháp truyền thống. Tuy nhiên một số phương pháp sinh học phân tử tạo thuận lợi cho việc định danh mang tính quyết định và phân kiểu (typing) các chủng phân lập *Brucella*.

37.7.3. Soi dưới kính hiển vi

Nhuộm Gram mẫu thử không giúp chứng minh được *Brucella* có trong mẫu thử vì kích thước của vi khuẩn này nhỏ và chúng nằm trong nội bào.

37.7.4. Môi trường nuôi cấy

(1). Môi trường cơ bản: phân lập trực tiếp và nuôi cấy *Brucella* thường được tiến hành trên môi trường rắn. Vì nuôi cấy trên môi trường rắn thường là phương pháp phù hợp nhất để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc dùng cho phân lập và giúp nhận biết rõ ràng. Nhiều môi trường cơ bản để nuôi cấy *Brucella* như: môi trường thạch cơ bản *Brucella*, tryptose/trypticase soy (TSA). Thêm 2 - 5% huyết thanh bò hay ngựa cần thiết

để các chủng như *B. abortus* bv. 2 tăng trưởng và nhiều phòng thí nghiệm sử dụng các môi trường cơ bản có sẵn huyết thanh như môi trường thạch máu hay thạch Columbia cho kết quả vi khuẩn tăng trưởng tuyệt vời. Có thể sử dụng các môi trường khác như serum - dextrose agar (SDA) hay glycerol - dextrose agar. SDA thích hợp để quan sát hình dạng khuẩn lạc. Môi trường không chọn lọc Castañeda được khuyến cáo sử dụng để phân lập *Brucella* từ máu và dịch cơ thể hay sữa, khi đó cần nuôi cấy làm giàu. Môi trường Castañeda được sử dụng là bởi vì brucellae có khuynh hướng phân tán trong môi trường lỏng này và điều này làm cản trở việc phân kiểu sinh học (biotyping) theo các kỹ thuật vi khuẩn học truyền thống.

(2). Môi trường chọn lọc: tất cả môi trường cơ bản trên có thể sử dụng làm môi trường chọn lọc khi thêm một lượng kháng sinh phù hợp vào môi trường để ức chế sự tăng trưởng của các vi sinh vật khác ngoài *Brucella*. Môi trường chọn lọc được sử dụng rộng rãi nhất là môi trường Farrell (FM) cải tiến. Theo đó 1 lít môi trường thêm: 5 mg polymyxin B sulphate; 25 mg bacitracin; 50 mg natamycin; 5 mg nalidixic acid; nystatin (100.000 đơn vị); 20 mg vancomycin. Bổ sung một lượng tương ứng kháng sinh dạng đông khô. Tuy nhiên nalidixic acid và bacitracin, ở nồng độ đậm đặc được sử dụng trong FM, có tác động làm ức chế một số chủng của *B. abortus*, *B. melitensis* và *B. suis*. Cho nên việc sử dụng đồng thời FM và môi trường nuôi cấy ít chọn lọc như Thayer - Martin cải biến (mTM) được xem là lựa chọn phù hợp nhất để phân lập *Brucella* từ mẫu thú y hiện trường. Tuy nhiên môi trường mTM thì không có màu sắc trong mờ vì có chứa haemoglobin là thành phần cơ bản, vì vậy không phù hợp để quan sát trực tiếp hình dạng khuẩn lạc, và vì vậy hầu hết quy trình thực hành có lẽ chỉ dùng môi trường này để xác định *Brucella* giả định. Môi trường nuôi cấy chọn lọc mới và có màu đục mờ có tên là CITA là môi trường công thức. Để pha chế môi trường này, sử dụng môi trường thạch máu cơ bản, sau đó bổ sung 5% huyết thanh cừu vô trùng có kháng sinh vancomycin (20 mg/l), colistin methanesulfonate (7,5 mg/l), nitrofurantoin (10 mg/l), nystatin (100.000 IU/l) và amphotericin B (4 mg/l). Hỗn hợp kháng sinh này có thể được chuẩn bị như sau: cân vancomycin, colistin và nystatin trong vật chứa 50 ml vô trùng, sau đó hóa lỏng vào hỗn hợp thành 10 ml theo tỷ lệ 1:1 dung dịch methanol tan hoàn toàn trong nước tinh

khiết vô trùng. Sau đó cân nitrofurantoin trong ống nghiệm vô trùng và hòa tan trong 1 ml dung dịch NaOH 0,1 M đã được lọc qua màng lọc 0,22 μm . Cuối cùng cho 10 mg amphotericin B vào vật chứa 20 ml vô trùng và hòa tan trong 1 ml dimethyl sulphoxide. Khi đã hòa tan hoàn toàn (5 - 10 phút), thêm 9 ml muối đệm phosphate vô trùng để thành 10 mM (PBS) ($\text{pH}=7,2 \pm 0,2$). Nồng độ cuối cùng của amphotericin B sẽ là 1 mg/ml; 4 ml của dung dịch này sử dụng cho 1 lít môi trường. Phần còn lại của Amphotericin B có thể được giữ ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong một vài ngày. Môi trường CITA mới này ức chế hầu hết các vi sinh vật ô nhiễm nhưng đồng thời lại cho phép các loài *Brucella* tăng trưởng và môi trường này nhạy hơn cả môi trường mTM và Farrell, dùng để phân lập tất cả các loài *Brucella* từ mẫu hiện trường, vì vậy môi trường chọn lọc này được lựa chọn phân lập toàn bộ *Brucella*, mặc dù khi sử dụng đồng thời cả hai môi trường FM và CITA sẽ cho độ nhạy cao nhất.

Ngược lại trường hợp này, với một số biovar *B. abortus* cũng như của *B. ovis*, sự tăng trưởng của *B. melitensis* hay *B. suis* không phụ thuộc vào việc ủ trong môi trường không khí có 5 - 10% CO_2 hay không (Bảng 37.2), nhưng môi trường không khí giàu CO_2 này sẽ là tối thích để nuôi cấy tất cả các *Brucella*.

Cần nuôi cấy tăng sinh khi số lượng *Brucella* trong sữa, sữa non và một số mẫu mô thấp. Trong trường hợp của sữa, có thể cải tiến bằng cách ly tâm và nuôi cấy cả kem và viên vón vào môi trường lỏng, tuy nhiên trong trường hợp này cần phải tiến hành các biện pháp an toàn để tránh các sol khí phát tán. Phương cách thực nghiệm nhằm gia tăng độ nhạy trong nuôi cấy sữa nhằm tránh nguy cơ của việc ly tâm làm tăng số lượng vi khuẩn trên cả hai đĩa nuôi cấy FM và CITA trong thử nghiệm mẫu, mỗi đĩa cấy 0,5 ml sữa. Tăng sinh có thể được tiến hành trong môi trường lỏng có huyết thanh - dextrose, tryptose (hay trypticase) - soy broth (TSA) hay môi trường lỏng *Brucella* có bổ sung hỗn hợp kháng sinh, ít nhất là amphotericin B (1 $\mu\text{g/ml}$) và vancomycin (20 $\mu\text{g/ml}$) tính theo nồng độ cuối. Môi trường tăng sinh cần được ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ có bổ sung 5 - 10% (v/v) CO_2 trong hơn 6 tuần, hàng tuần cấy chuyển sang môi trường thạch chọn lọc FM và CITA. Tốt nhất nếu được nên sử dụng hệ thống lưỡng phase gồm môi trường chọn lọc rắn và lỏng trong cùng một lọ nuôi cấy hay còn gọi là phương pháp Castañeda nhằm làm

giảm thiểu cấy chuyển, giảm nguy cơ lây lan vi khuẩn. Môi trường chọn lọc lưỡng phase gồm môi trường cơ bản Castañeda có bổ sung kháng sinh trong pha lỏng, đôi khi được khuyến cáo sử dụng để phân lập *Brucella* trong sữa (số lượng được tính trên lít môi trường): polymyxin B (sulphate) (6.000 đơn vị = 6 mg); bacitracin (25.000 đơn vị = 25 mg); natamycin (50 mg); nalidixic acid (5 mg); amphotericin B (1 mg); vancomycin (20 mg); D-cycloserine (100 mg).

Tất cả môi trường nuôi cấy được sử dụng phải kiểm soát chất lượng bằng chủng chuẩn. Nên sử dụng các chủng yêu cầu dinh dưỡng khó tính như *B. abortus* bv. 2, *B. ovis* hay *B. suis* bv. 2 để kiểm soát chất lượng môi trường.

Trên môi trường rắn thích hợp, khuẩn lạc *Brucella* có thể dễ dàng nhận thấy sau 3 đến 4 ngày ủ. Sau 4 ngày ủ, khuẩn lạc *Brucella* có dạng tròn, đường kính 1 - 2 mm, có rìa nhẵn. Màu sắc khuẩn lạc đục mờ và có màu mật ong nhạt khi khuẩn lạc được xem dưới ánh sáng chiếu qua môi trường trong suốt. Nhìn từ bên trên, khuẩn lạc lồi lên và có màu trắng ngọc trai. Nếu tiếp tục ủ thêm, khuẩn lạc trở nên lớn hơn và tối hơn tí. Các chủng *Brucella* nhẵn (S) có khuynh hướng thay đổi trong quá trình tăng trưởng, nhất là khi cấy chuyển, và chuyển thành dạng ráp (R). Sau đó khuẩn lạc ít trong hơn, có nhiều hạt hơn, bề mặt đục và màu sắc dao động từ trắng mờ đến màu nâu trong ánh sáng phản chiếu và ánh sáng truyền qua. Dễ dàng kiểm tra sự phân tán này bằng cách nhuộm crystal violet: chủng ráp sẽ ăn chất nhuộm có màu đỏ tím và chủng nhẵn không ăn màu chất nhuộm hay có màu vàng nhạt. Nếu khuẩn lạc là nhẵn, tiến hành kiểm tra huyết thanh kháng đối với *Brucella* như huyết thanh kháng A và M. Trong trường hợp các khuẩn lạc không nhẵn, các chủng phân lập được kiểm tra bằng huyết thanh kháng cho kháng nguyên *Brucella* R. Những thay đổi về hình thái khuẩn lạc thường liên quan đến những thay đổi về độc lực, đặc điểm huyết thanh hay tính nhạy cảm với phage. Hình thái khuẩn lạc điển hình và ngưng kết với huyết thanh kháng *Brucella* đặc trưng cho kết quả dương, sau đó là thử nghiệm oxidase và urease, cho phép xác định sơ bộ chủng phân lập này là *Brucella*. Tuy nhiên sau đó các chủng xác định này cần phải được khẳng định để có kết luận chính xác.

37.7.5. Nuôi cấy

Phân lập *Brucella* từ máu và các mẫu bệnh phẩm khác nhau là chẩn đoán mang

tính quyết định bệnh do brucella. Khoảng 5 - 10 mL máu được thu thập trong 200 mL môi trường lỏng có huyết thanh, dextrose hay môi trường lỏng trypticase soy và ủ ở 37°C dưới 5 - 10% CO₂. Sau bốn ngày ủ, nuôi cấy thuần trên môi trường rắn, cứ mỗi 3 - 5 ngày cho đến 8 tuần trước khi kết luận là âm tính.

Phương pháp Castañeda dùng để nuôi cấy máu, đây là phương pháp dùng để nuôi cấy máu mà không cần cấy chuyển trên môi trường rắn, nhờ đó tránh được khả năng làm lây nhiễm khuẩn. Môi trường hai pha này chứa dịch lỏng trypticase soy và thạch rắn



nghiêng trypticase soy trong cùng một chai. Máu được cấy vào phần lỏng và sau đó ủ chai theo hướng úp ngược. Khi cấy chuyển không cần mở nắp chai ra; thay vào đó làm nghiêng chai để dung dịch tràn lên phần thạch nghiêng. Sau đó ủ úp ngược, nếu mẫu mẫu có vi khuẩn, khuẩn lạc sẽ xuất hiện trên phần nghiêng.

Hình 37.4. Minh họa chai chứa hai pha môi trường trypticase soy thạch rắn và trypticase soy lỏng.

Phương pháp nuôi cấy máu Castañeda cũng làm giảm nguy cơ nhiễm trùng mắc phải tại phòng thí nghiệm cho cả nhân viên xét nghiệm và nhân viên trợ giúp. Độ nhạy của nuôi cấy máu dao động trong khoảng từ 30% đến 50% phụ thuộc vào loài *Brucella* phân lập được. *B. melitensis* và *B. suis* thường được phát hiện trong du khuẩn huyết và vì thế dễ dàng nuôi cấy hơn so với loài *B. abortus*.

Nuôi cấy tuỷ xương thì nhạy hơn so với nuôi cấy máu. Phương pháp này thường cho kết quả dương trong trường hợp nuôi cấy máu và huyết thanh học cho kết quả âm. Nuôi cấy hoạt dịch cho kết quả dương ở 50% bệnh nhân.

37.7.6. Xác định vi khuẩn

Xác định hình dạng *Brucella* bằng nhuộm Gram vi khuẩn từ khuẩn lạc, quan sát hình dạng khuẩn lạc, thử nghiệm sinh hoá và hoạt tính với huyết thanh kháng brucella có đặc điểm như sau:

- (1). *Brucella* sp. có kích thước nhỏ, hình dạng cầu trực khuẩn, Gram âm;
- (2). Tăng trưởng chậm; hình thành khuẩn lạc nhỏ, ẩm ướt, trong mờ và sáng lấp lánh sau 3 ngày ủ;

Sơ đồ 1. Đặc điểm xác định *Brucella* sp.

- ① Có kích thước nhỏ, hình dạng cầu trực khuẩn, Gram âm
- ② Tăng trưởng chậm; hình thành khuẩn lạc nhỏ, ẩm ướt, trong mờ và sáng lấp lánh sau 3 ngày ủ
- ③ Tăng trưởng có mặt của chất nhuộm aniline như như chất màu basic fuchsin hay thionine
- ④ Có khả năng sử dụng glutamic acid, ornithine, lysine và ribose đồng thời tạo H_2S ; Có oxidase dương
- ⑤ Ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu kháng brucella
- ⑥ Nhạy cảm với bacteriophage

(3). Tăng trưởng khi có mặt của chất nhuộm aniline như như chất màu basic fuchsin hay thionine;

(4). Có khả năng sử dụng glutamic acid, ornithine, lysine và ribose đồng thời tạo H_2S ;

(5) Có oxidase dương;

(6). Ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu kháng brucella;

(7). Nhạy cảm với bacteriophage.

Sơ đồ 37.1. Tóm tắt đặc điểm khuẩn lạc và sinh hoá.

37.7.7. Định danh và phân kiểu

Nhuộm Gram vi khuẩn để xem biểu hiện hình dạng đặc trưng của *Brucella*. Khi các đặc điểm huyết thanh, nhạy cảm với chất nhuộm và phage thường bị thay đổi trong các pha không nhẵn, nên việc chú ý về hình thái khuẩn lạc thì cần thiết trong thử nghiệm phân kiểu. Phương pháp khuyến cáo để quan sát hình thái là phương pháp Henry, bằng cách cho ánh sáng phản chiếu xiên qua khi quan sát, thử nghiệm acriflavine được Braun & Bonestell mô tả hoặc phương pháp White & Wilson sử dụng crystal violet để nhuộm tế bào vi khuẩn.

Định danh *Brucella* cần được tiến hành bằng cách kết hợp các thử nghiệm sau: (a). Quan sát hình thái tế bào sau khi nhuộm Gram, (b). Xem xét hình dạng khuẩn lạc,

(c). Đặc điểm tăng trưởng, (d). Thử nghiệm sinh hóa như: urease, oxidase và thử nghiệm ngưng kết trên lam với huyết thanh đa dòng kháng *Brucella*.

Định danh loài và biovar đòi hỏi phải tiến hành thử nghiệm phức tạp như: thử nghiệm phân giải do phage và thử nghiệm ngưng kết với huyết thanh kháng không chuyên biệt A, M hay R, việc tiến hành các thử nghiệm này nên thực hiện ở phòng thí nghiệm chuẩn, cùng với đó là phương pháp thử phải được công nhận. Việc sử dụng đồng thời một số phage ví dụ Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz1) và R/C làm hệ thống phân kiểu phage, cho phép định danh các loài *Brucella*, phải được các nhân viên có kinh nghiệm thực hiện. Tuy nhiên một số đặc tính ví dụ như đòi hỏi phải có thêm CO₂ để tăng trưởng, sản sinh H₂S (được phát hiện bằng giấy chì acetate) và tăng trưởng khi có mặt của basic fuchsin và thionin, là những thử nghiệm thường quy có thể tiến hành ở nhiều phòng thí nghiệm.

Để duy trì các chủng của *B. abortus*, *B. melitensis* hay *B. suis* cũng như để gửi chúng đến phòng thí nghiệm chuẩn cho phân kiểu, điều quan trọng là chỉ nên chọn các chủng nhẵn. Các chủng nuôi cấy có thể duy trì trong thời gian ngắn ở 5°C ± 3°C, nhưng để lưu giữ lâu hơn cần phải đông khô hay bảo quản trong ống nghiệm có nắp vặn ở ≤ -16°C trong dung dịch tryptose có 15% glycerol (v/v). Để vận chuyển, chủng cần phải được đông khô và hàn kín miệng trong đóng gói dạng ampoule chứa trong các hộp nhỏ có nắp vặn hoặc cấy chuyển sang môi trường thạch dinh dưỡng ở các chai có nắp vặn. Các chủng này cũng có thể đưa vào môi trường vận chuyển như Amies chẳng hạn nhưng lưu ý tránh sự phân tán của chúng.

Để vận chuyển các chủng *Brucella*, cần vặn kỹ nắp của các vật chứa và hàn kín miệng bằng PVC (polyvinyl chloride). Các chai chứa chủng cần gói trong giấy thấm hoặc len bông, hàn kín trong các túi polyethylene và gói trong thùng chứa cứng (đóng gói ba lớp) theo yêu cầu của Hiệp hội Vận chuyển Hàng không Quốc tế (IATA) về vận chuyển hàng hóa nguy hiểm.

37.7.8. Chẩn đoán bằng huyết thanh

Thử nghiệm bằng huyết thanh được sử dụng để chẩn đoán bệnh cận lâm sàng do brucella và các trường hợp bệnh cấp tính và mạn tính do brucella bằng cách chứng minh

kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh cơ thể chủ. Kháng thể đặc hiệu cho brucella là cả IgG và IgM xuất hiện trong huyết thanh từ 7 - 10 ngày sau khi nhiễm trùng. IgM tồn tại trên 3 tháng sau khi các kháng thể khác giảm. Sau đó IgG và IgA xuất hiện sau 3 nhiễm trùng và tồn tại trong thời gian dài hơn. Vì vậy, trong giai đoạn cấp tính hay bệnh cận lâm sàng do brucella, cả IgG và IgM có thể được chứng minh; ở bệnh mạn tính do brucella, chỉ có thể chứng minh được IgG, do không có IgM.

Khi kháng thể IgG bền vững trong nhiều tháng hoặc nhiều năm, việc chứng minh một lượng lượng kháng thể gia tăng đáng kể là bằng chứng huyết học mang tính quyết định của bệnh do brucella gây ra. Gia tăng một lượng gấp 4 lần hoặc lượng kháng thể đơn tăng cao 1:160 là bằng chứng giả định của bệnh xâm nhiễm do *Brucella*.

B. abortus được sử dụng như là kháng nguyên trong thử nghiệm ngưng kết brucella là do kháng thể chống lại *B. melitensis* hay *B. suis* có thể phản ứng chéo với kháng nguyên *B. abortus*. Kháng nguyên *B. abortus* không những phát hiện kháng thể chuyên biệt chống lại kháng nguyên của chính nó mà còn phát hiện kháng thể được sản xuất ra chống lại *B. melitensis* và *B. suis*. Tuy nhiên kháng thể chống lại *B. abortus* không phản ứng với *B. canis*. Vì thế kháng nguyên chuyên biệt *B. canis* được sử dụng để phát hiện kháng thể trong huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm vi khuẩn này. Một lượng phương pháp thử dùng để thử nghiệm huyết thanh đã được phát triển và thử nghiệm huyết thanh của brucella. Phương pháp Common là (a) thử nghiệm chuẩn ngưng kết chuẩn trong ống nghiệm, (b) thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang bán trực tiếp và (c) ELISA.

(a). Thử nghiệm chuẩn ngưng kết chuẩn trong ống nghiệm: thử nghiệm này vẫn là phương pháp chuẩn và là thử nghiệm huyết thanh thường được sử dụng nhất dùng để chẩn đoán brucella. Phương pháp này phát hiện sự hiện diện kháng thể chống lại thành phần LPS của *Brucella*. Thử nghiệm này được sử dụng để tiêu diệt các chủng *B. abortus* dùng làm kháng nguyên và dùng để chẩn đoán bệnh brucella do *B. abortus*, *B. melitensis* và *B. suis* gây ra. Thử nghiệm này thì không được sử dụng cho để phát hiện bệnh xâm nhiễm do *B. canis* gây ra là do khuẩn này không có polysaccharide O trên bề mặt; nên không sản sinh ra kháng thể chống lại LPS.

Thử nghiệm ngưng kết được xem là dương tính khi lượng kháng thể lớn hơn hoặc bằng 1 trong 160 hoặc khi lượng tăng gấp bốn lần được chứng minh trong huyết thanh người phục hồi. Điều đặc biệt quan trọng là bệnh nhân đến từ vùng bị dịch có lượng kháng thể tăng, theo đó lượng kháng thể 1 trong 160 thì không phải hiếm ở những người không biểu hiện triệu chứng.

Thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm cải biên: trong thử nghiệm này, 2-mercaptoethanol được thêm vào huyết thanh người bệnh trước khi thử nghiệm. Việc thêm mercaptoethanol làm đảo lộn cầu nối disulfide của IgM; theo đó chỉ có IgG mới được phát hiện. Thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm cải biên này được sử dụng để phát hiện một cách chuyên biệt kháng thể IgG và lượng kháng thể cao hơn 1:80 được cho là xâm nhiễm chủ động. Lượng kháng thể IgG cao hay lượng cao hơn sau khi điều trị được cho bệnh tái phát hoặc bệnh dai dẳng. Thử nghiệm này được sử dụng để chẩn đoán bệnh do brucella trong quá trình phục hồi.

(b). Phương pháp phát huỳnh quang bán trực tiếp: phương pháp này thì nhạy để phát hiện kháng thể brucella trong huyết thanh, có thể cho kết quả dương tính ngay cả khi các thử nghiệm ngưng kết cho kết quả âm.

(c). Phương pháp miễn dịch dựa trên enzyme liên kết: ELISA là thử nghiệm nhạy nhất dùng để phát hiện kháng thể IgM, IgA và IgG của brucella trong bệnh cấp tính và mạn tính do brucella gây ra. Trong thử nghiệm này, protein tế bào chất *Brucella* đã làm nghèo LPS được sử dụng làm kháng nguyên. Việc sử dụng kháng nguyên này cho phép đánh giá chính xác của việc thay thế bệnh do brucella ở những bệnh nhân bởi vì kháng nguyên LPS trong máu (antigenemia) tồn tại trong một thời gian dài hơn kháng nguyên là protein.

ELISA là công cụ hữu dụng dùng để chẩn đoán bệnh thần kinh do brucella bằng cách chứng minh kháng thể brucella có trong CSF. Tuy nhiên các thử nghiệm huyết thanh này có thể cho kết quả sai sót là do các yếu tố sau:

(i). Kháng thể hình thành khối: kháng thể hình thành khối hay không ngưng kết trong huyết thanh có thể góp phần làm cho kết quả dương tính giả. Điều này có thể tránh được bằng cách gia nhiệt huyết thanh lên 55°C trong 30 phút hoặc bằng cách sử dụng

saline 4% hoặc pha loãng trong thử nghiệm. Kháng thể hình thành khối này có thể được pha loãng bằng cách thêm antihuman globulin vào hỗn hợp huyết thanh và kháng nguyên (thử nghiệm Coombs).

(ii). Hiện tượng prozone: thường là vấn đề gặp phải trong chẩn đoán bệnh do brucella. Điều này xảy ra là do hàm lượng kháng thể brucella cao trong huyết thanh, được tạo ra do hyperantigenemia. Hiện tượng prozone làm gia tăng thử nghiệm âm tính giả. Điều này có thể tránh được bằng cách pha loãng thường quy huyết thanh ít nhất 1:320 vì thế làm ức chế sự ngưng kết có thể xảy ra ở độ pha loãng thấp.

(iii). Phản ứng chéo với *V. cholerae*, *Y. enterocolitica* serotype O9, *F. tularensis* và *Salmonella* species có thể gây ra kết quả dương tính giả là do sự hiện diện của LPS có trong các vi khuẩn này làm xuất hiện phản ứng chéo. Kháng thể cảm ứng Cholera có thể loại bỏ bằng sự hấp thu 2-mercaptoethanol.

(iv). Ở những bệnh nhân phục hồi thì lượng kháng thể sẽ giảm.

37.7.9. Thử nghiệm brucella trên da

Thử nghiệm brucella trên da là kiểu làm trễ của phản ứng quá mẫn cảm với kháng nguyên brucella. Trong thử nghiệm này, yếu tố brucellin, là một protein ly trích của vi khuẩn, được sử dụng như là một kháng nguyên và được đưa vào dưới da. Sự hiện diện của ban đỏ (erythema) và trở nên cứng của vùng da có đường kính 6 mm hoặc lớn hơn trong vòng 24 giờ được cho là phản ứng dương. Thử nghiệm này chỉ dương trong trường hợp bị bệnh mạn tính do brucella nhưng có kết quả âm trong trường hợp bị bệnh cấp tính do brucella. Thử nghiệm cho kết quả âm lặp lại khẳng định không bị bệnh do brucella gây ra.

37.7.10. Phương pháp phân tử

PCR được áp dụng để phát hiện nhanh các loài *Brucella*. Thử nghiệm này vẫn đang còn trong giai đoạn thí nghiệm.

37.7.11. Thử nghiệm khác

Xét nghiệm tủy xương cho thấy sự thực bào hồng cầu (erythrophagocytosis) và nuôi cấy CSF bệnh thần kinh do brucella cho thấy có chứng tăng lympho bào dịch tủy (pleocytosis), làm tăng mức protein và giãn não tủy (hypoglycorrhea). Nhiễm khuẩn

huyết (anemia) xảy ra ở 75% bệnh nhân, giảm lượng tiểu cầu (thrombocytopenia) ở 40% và giảm toàn thể huyết cầu (pancytopenia) ở 6% bệnh nhân là những đặc điểm khác của bệnh.

37.7.12. Phát hiện bệnh ở động vật tại phòng thí nghiệm

Việc phát hiện bệnh do brucella ở động vật chủ yếu được dựa trên phương pháp tương tự với phát hiện bệnh xâm nhiễm ở người do vi khuẩn này gây ra. Thêm vào đó nuôi cấy sữa và nước tiểu từ động vật bị nhiễm có thể cho kết quả dương. Thử nghiệm ngưng kết latex và thử nghiệm Rose Bengal card là những phương pháp chẩn đoán nhanh, được sử dụng để chẩn đoán nhanh bệnh do brucella ở quần thể gia súc.

(a). Thử nghiệm vòng sữa: thử nghiệm này thường sử dụng huyết thanh để chứng minh kháng thể trong sữa động vật. Đây là thử nghiệm sàng lọc được sử dụng để phát hiện *Brucella* có trong gia súc bị nhiễm. Trong thử nghiệm này, dịch huyền phù đậm đặc vi khuẩn *B. abortus* hay *B. melitensis* đã làm chết qua nhuộm bằng hematoxylin, được sử dụng như là kháng nguyên. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách thêm một giọt kháng nguyên đã nhuộm màu vào mẫu sữa chứa trong ống nghiệm. Sau đó trộn và huyền phù sau trộn được ủ trong bể điều nhiệt ở 70°C trong 40 - 50 phút. Ở thử nghiệm dương tính, nếu kháng thể có trong sữa, thì trực khuẩn sẽ ngưng kết và nổi kem lên để hình thành vòng xanh tách biệt trên đỉnh. Ở thử nghiệm âm, sữa có màu xanh đồng nhất không hình thành vòng có màu.

37.8. Điều trị

Brucellae nhạy cảm với một số kháng sinh sử dụng qua đường miệng và nhóm aminoglycoside. Khi kết hợp giữa tetracycline và doxycycline sẽ mang lại hiệu quả để chống lại hầu hết các loài *Brucella*. Sự tái phát xảy ra phổ biến khi điều trị chỉ sử dụng một loại kháng sinh. Vì vậy khuyến cáo đưa ra nên có sự kết hợp các kháng sinh khi điều trị. Kết hợp doxycycline với rifampin thì hiệu quả. Doxycycline liều dùng 200 mg/ngày qua uống kết hợp với streptomycin 1 g/ngày qua cơ trong 2 - 3 tuần là liệu pháp hiệu quả nhất để điều trị hầu hết các dạng bệnh do brucella ở người lớn.

Hầu hết người bệnh phản ứng phản ứng với liệu pháp 6 tuần, sử dụng kết hợp rifampin và doxycycline qua uống. Chỉ khoảng ít hơn 10% bệnh nhân tái phát. Sử dụng

doxycycline trong 6 tuần cùng với streptomycin cho 3 tuần đầu thì cũng hiệu quả. Sự tái phát bệnh do brucella là do liệu pháp điều trị không đủ và không phải là do sự phát triển của kháng kháng sinh.

37.9. Ngăn chặn và kiểm soát

Thanh trùng pasteur hay đun sôi sữa là biện pháp quan trọng để ngăn ngừa sự lan truyền bệnh do brucella ở người, hầu hết bệnh ở người mắc phải là do uống sữa và các sản phẩm của sữa bị nhiễm. Cũng vậy, khi tiếp xúc với vật nuôi cần sử dụng áo bảo hộ và găng tay để ngăn chặn sự lan truyền bệnh từ động vật.

Vaccine thì hiệu quả để kiểm soát bệnh do brucella ở động vật. Vaccine vi khuẩn sống *B. abortus* có chứa chủng 1019 đã làm suy yếu, được sử dụng thành công để ngăn chặn bệnh xâm nhiễm ở gia súc. *Brucella abortus* chủng 19 là vaccine tham chiếu tương ứng để kiểm soát sự xâm nhiễm của Brucella ở gia súc và cừu và chủng Rev.1 *B. melitensis* được sử dụng để kiểm soát bệnh ở dê. Vaccine chủng ráp RB51 của *B. abortus* được một số quốc gia sử dụng làm vaccine chính thức để ngăn chặn sự xâm nhiễm của *B. abortus* ở gia súc. Chưa có vaccine phù hợp để kiểm soát bệnh Brucella ở heo. Chưa sản xuất được vaccine cho *B. suis* hay *B. canis*. Chưa có vaccine dạng thương mại cho người.