

Chương 41. Clostridium

Mục lục

Chương 41. Clostridium	1
41.1. Giới thiệu	3
41.2. Đặc điểm chung của clostridia.....	3
41.2.1. Clostridium.....	3
41.2.2. Hình thái.....	4
41.2.3. Bào tử	5
41.2.4. Nuôi cấy	7
41.2.5. Nhạy cảm với kháng sinh.....	7
41.3. Clostridium perfringens.....	7
41.3.1. Đặc điểm của vi khuẩn	8
41.3.2. Đặc điểm gây bệnh.....	10
41.3.3. Hội chứng lâm sàng.....	14
41.3.4. Dịch tễ học	16
41.3.5. Phát hiện tại phòng thí nghiệm.....	17
41.3.6. Điều trị.....	20
41.3.7. Phòng ngừa và kiểm soát	21
41.4. Clostridium tetani	21
41.4.1. Đặc điểm của vi khuẩn	21
41.4.2. Đặc điểm gây bệnh.....	23
41.3.2. Miễn dịch của cơ thể chủ	26
41.3.3. Dịch tễ học	29
41.3.4. Phát hiện tại phòng thí nghiệm.....	30
41.3.5. Điều trị.....	33
41.3.6. Ngăn ngừa và kiểm soát	34
41.4. Clostridium botulinum.....	35

41.4.1. Đặc điểm vi khuẩn.....	36
41.4.2. Đặc điểm gây bệnh.....	38
41.4.3. Dịch tễ học	42
41.4.4. Phương pháp phát hiện.....	44
41.4.5. Điều trị.....	47
41.4.6. Ngăn chặn và kiểm soát	48
41.5. <i>Clostridium difficile</i>	49
41.5.1. Giới thiệu.....	49
41.5.2. Đặc điểm sinh học	49
41.5.3. Đặc điểm gây bệnh.....	50
41.5.4. Phát hiện.....	51
41.5.5. Điều trị.....	52

41.1. Giới thiệu

Giống *Clostridium* gồm những trực khuẩn Gram dương, có kích thước tương đối lớn, tế bào có dạng hình que nhọn, sống kỵ khí và có khả năng hình thành nội bào tử. Nội bào tử có đặc điểm rộng lớn hơn tế bào vi khuẩn bình thường, nên làm cho vi khuẩn có hình dạng phồng lên trông giống như con thoi vì vậy khuẩn này được đặt tên là *Clostridium*. Tên này xuất phát từ tên *kloster*, có nghĩa là con thoi.

Clostridia là vi khuẩn sống trong các môi trường kỵ khí, nơi có chất hữu cơ hiện diện gồm: đất, chất trầm lắng dưới nước, đường ruột động vật. Clostridia có khả năng lên men nhiều hợp chất hữu cơ. Trong quá trình lên men đường, khuẩn này sản sinh ra các sản phẩm cuối như acid butyric, acid acetic, butanol và acetone, cùng với đó là một lượng lớn khí gồm CO₂ và H₂. Nhiều hợp chất có mùi khó chịu được hình thành trong quá trình lên men amino acid và acid béo. Clostridia cũng tạo ra nhiều loại enzyme ngoại bào để phá hủy các phân tử sinh học như protein, lipid, collagen, cellulose, ... có trong môi trường để thành các hợp chất có thể lên men. Vì vậy clostridia đóng vai trò quan trọng về phân hủy sinh học trong tự nhiên và trong chu trình carbon.

Ở bệnh xâm nhiễm kỵ khí do clostridia, enzyme ngoại bào do vi khuẩn sinh ra này đóng vai trò trong sự xâm lấn và biểu hiện bệnh lý.

Hầu hết clostridia là nhóm vi khuẩn hoại sinh nhưng một số là vi khuẩn gây bệnh cho người chủ yếu là các loài *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* và *C. difficile*. Những loài này là vi khuẩn gây bệnh chủ yếu tồn tại ở dạng hoại sinh trong tự nhiên và trong hiểu biết của con người, chúng là những vi khuẩn gây bệnh cơ hội. *C. tetani* và *C. botulinum* tạo ra các độc tố sinh học có hoạt lực lớn nhất tác động đến con người và động vật như tạo độc tố gây bệnh uốn ván và độc tố botulin gây ngộ độc thực phẩm. Tuy nhiên các loài clostridia khác có khả năng xâm lấn cao trong những điều kiện cụ thể.

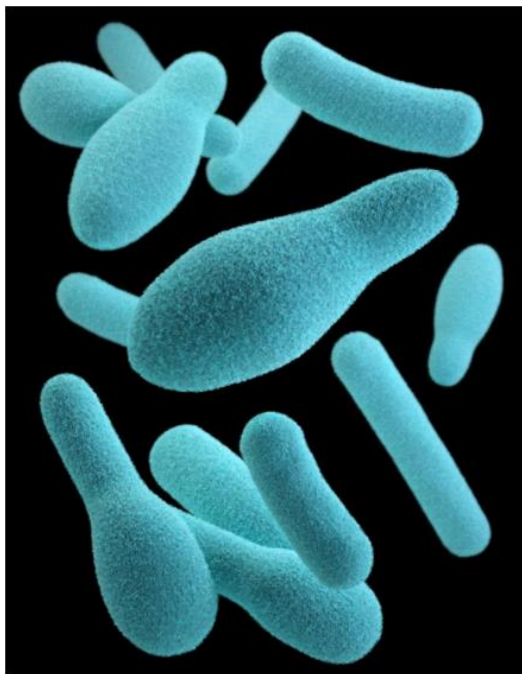
41.2. Đặc điểm chung của clostridia

41.2.1. Clostridium

Hiện nay có nhiều phương pháp đã được sử dụng để phân loại clostridia. Phương pháp truyền thống phân loại *Clostridium* là dựa trên sự kết hợp các đặc điểm khác nhau

gồm:

- (1). Tăng trưởng tối thích trong điều kiện kỵ khí.
- (2). Hình thành bào tử.
- (3). Thử nghiệm sinh hoá.



(4). Phân tích các sản phẩm biến dưỡng của vi khuẩn bằng sắc ký khí.

Khi tiến hành phân loại theo phương pháp này, có hơn 130 loài đã được mô tả thuộc giống *Clostridium*. Hầu hết các loài là hoại sinh vô hại trong đất, nước, chất thải và sản phẩm thực vật, động vật bị phân huỷ. *Clostridium* cũng là một phần của hệ vi khuẩn bình thường trong tuyến dạ dày ruột ở người và động vật.

Hình 41.1. Hình ảnh 3D của *Clostridium* sp. được tạo ra dựa trên ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), nguồn CDC.

Chỉ có một số ít trong số hơn 130 loài loài *Clostridium* thì gây bệnh cho người. Clostridia thường liên quan đến nhiễm trùng da và mô mềm, tiêu chảy liên quan đến sử dụng kháng sinh và gây ngộ độc thực phẩm. Bệnh uốn ván, hoại thư sinh khí hay gọi là khí hư (gas gangrene) và ngộ độc do độc tố botulin là ba triệu chứng lâm sàng chính do các loài *Clostridium* gây ra.

Đặc tính gây bệnh của clostridia có những đặc điểm như sau:

- (1). *Clostridium* có khả năng sản sinh ra một lượng độc tố thần kinh, độc tố đường ruột và độc tố phân giải mô.
- (2). Khuẩn này tồn tại ở dạng bào tử khi điều kiện môi trường bất lợi.
- (3). *Clostridium* tăng trưởng tốt trong môi trường giàu dinh dưỡng ở điều kiện kỵ khí. Các loài gây bệnh và bệnh ở người do *Clostridium* gây ra được liệt kê ở Bảng 41.1.

41.2.2. Hình thái

Clostridia biểu hiện các đặc điểm về hình thái sau:

(1). Hầu hết các loài thuộc nhóm này là kỵ khí nhưng một số ít loài như *C. tertium*, *C. histolyticum*, là những vi khuẩn chịu được oxygen và vì vậy chúng có thể tăng trưởng trên mặt thạch có không khí hiện diện.

(2). Clostridia là trực khuẩn dạng que, kích thước 3 - 8 x 0,4 - 1,2 μm .

(3). Trực khuẩn này có tính đa hình cao và biểu hiện dạng sợi dài và hình dạng phức tạp.

(4). *Clostridium* là vi khuẩn Gram dương nhưng các chủng già hơn xuất hiện Gram biến đổi và thậm chí biến thành Gram âm.

Bảng 41.1. Bệnh ở người do các loài *Clostridium*.

Vi khuẩn	Bệnh
<i>Clostridium perfringens</i>	Nhiễm trùng mô mềm như: viêm mô tế bào, viêm mạc, viêm cơ mưng mủ, hoại tử cơ do clostridium và hoại thư sinh khí; gây ngộ độc thực phẩm và nhiễm trùng máu
<i>Clostridium novyi</i>	Hoại thư sinh khí nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium sordelli</i>	Hoại thư sinh khí nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium septicum</i>	Hoại thư sinh khí nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium tetani</i>	Uốn ván
<i>Clostridium botulinum</i>	Ngộ độc do độc tố botulin
<i>Clostridium barati</i>	Ngộ độc do độc tố botulin nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium butyricum</i>	Ngộ độc do độc tố botulin nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium histolyticum</i>	Ngộ độc do độc tố botulin nhưng hiếm khi xảy ra
<i>Clostridium difficile</i>	Tiêu chảy liên quan đến kháng sinh
<i>Clostridium tertium</i>	Bệnh cơ hội

(5). Hầu hết các loài *Clostridium* di động nhờ tiên mao xung quanh ngoài trừ một số ít loài như *C. perfringens*, *C. tetani* type VI thì không có khả năng di động.

(6). Hầu hết các chủng clostridia không có capsule ngoại trừ *C. perfringens* và *C. butyricum*.

(7). Khả năng tạo nội bào tử là đặc điểm quan trọng của clostridia.

41.2.3. Bào tử

Hình thành bào tử ở Clostridia thì dao động và phụ thuộc vào loài. *Clostridium sporogenes* và các loài *Clostridium* khác dễ dàng sinh bào tử, trong khi khả năng sinh bào tử của *C. perfringens* và một số loài khác thì không ổn định. Hình thành bào tử diễn ra bên ngoài môi trường và bên trong cơ thể động vật chủ nhưng lại không xảy ra ở cơ thể người. Hình dạng và vị trí của bào tử trong tế bào vi khuẩn thì dao động ở các loài clostridium khác nhau như sau:

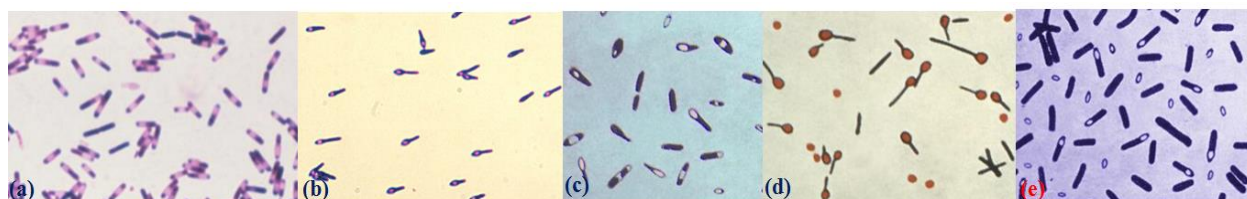
(a). Bào tử ở giữa tế bào: vị trí bào tử ở giữa xuất hiện ở các loài ví dụ như *Clostridium bifermentans*, *Clostridium difficile* làm cho vi khuẩn có dạng con thoi.

(b). Bào tử ở cận đầu cuối: vị trí bào tử xuất hiện ở *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* type A làm cho vi khuẩn có dạng hình giống như gậy đánh golf.

(c). Bào tử hình ovan ở đầu cuối: vị trí bào tử xuất hiện ở *Clostridium tertium*, *Clostridium chauvoei* làm cho vi khuẩn có hình dạng trông giống như vợt đánh quần vợt.

(d). Bào tử ở hình cầu ở đầu cuối: vị trí bào tử xuất hiện ở *Clostridium tetani*, làm cho vi khuẩn có hình dạng trông giống như dùi trống.

(e). Bào tử hình thành ở đầu cuối: vị trí bào tử xuất hiện ở *Clostridium botulinum*, làm cho vi khuẩn có hình dạng trông giống như dụng cụ khai bia.



Hình 41.2. Minh họa vị trí hình thành bào tử ở clostridia (a). *Clostridium difficile*, bào tử hình thành ở giữa tế bào; (b). *Clostridium botulinum* type A, bào tử hình thành ở cận đầu cuối; (c). *Clostridium chauvoei*, bào tử hình thành ở đầu cuối có hình ovan; (d). *Clostridium tetani*, bào tử ở đầu cuối trông giống như dùi trống và (e). *Clostridium botulinum*, bào tử hình thành ở đầu cuối trông giống dụng cụ khai bia.

Bào tử là hình thức kháng tương đối cao so với tế bào dinh dưỡng của vi khuẩn. Chúng biểu hiện mức độ kháng dao động đối với nhiệt, sự làm khô và chất khử trùng. Bào tử sẽ bị tiêu diệt trong dung dịch iodine 1% và glutaraldehyde 2% ở pH 7,5 - 8,5.

Bào tử có khả năng kháng được các chất khử trùng dạng phenol. Chúng có khả năng sống sót trên 5 ngày trong dung dịch formaldehyde 2%. Bào tử của *C. botulinum* sống sót trong ở nhiệt độ sôi 105°C trong 3 - 4 giờ, trong khi bào tử của *C. perfringens* và *C. tetani* nhanh chóng bị phá hủy trong thời gian nhỏ hơn 5 phút. Một số chủng *C. tetani* có khả năng kháng được nhiệt độ sôi trong 15 - 90 phút. Tuy nhiên chủng *C. perfringens* type A sống sót ở nhiệt độ sôi trong vài giờ.

41.2.4. Nuôi cấy

Hầu hết các loài clostridia là kỵ khí nhưng chỉ có một số ít loài như *C. tertium*, *C. histolyticum*, ... chịu được oxygen và có thể tăng trưởng được trên bề mặt thạch và thậm chí trong điều kiện có không khí. Khi có mặt một lượng đủ các chất có thể oxy hóa khử (Eh) thấp trong môi trường là yếu tố quan trọng cho sự tăng trưởng của vi khuẩn kỵ khí. Việc sử dụng các chất khử như ascorbic acid, glutathione, acid béo không bão hòa, cysteine, thioglycolic acid, alkaline glucose hay sắt kim loại nhằm duy trì thể oxy hóa khử thấp trong môi trường được áp dụng trong nuôi cấy và phân lập vi khuẩn. Hầu hết các chủng tăng trưởng tối thích ở nhiệt độ 37°C, trong khoảng pH từ 7 - 7,4. Sự tăng trưởng trên môi trường rắn thì dao động. Một số loài clostridium tạo sự tiêu huyết trên môi trường thạch máu. Môi trường Robertson lỏng có thịt chín (RCM) là môi trường thích hợp cho clostridium tăng trưởng. Môi trường này chứa acid béo không bão hòa, thịt đã cắt và phức hợp sulfhydryl. Khi clostridia tăng trưởng trong RCM sẽ làm cho môi trường này trở nên đục. Clostridia phân giải đường làm cho thịt có màu hồng, ngược lại các loài phân giải protein làm cho thịt có màu đen và tạo ra mùi hôi thối khó chịu. Hầu hết clostridia tạo ra khí.

41.2.5. Nhạy cảm với kháng sinh

Vi khuẩn này nhạy cảm với metronidazole, penicillin và cephalosporin. Khuẩn này ít nhạy cảm với tetracycline và có khả năng kháng được kháng sinh nhóm quinolone và nhóm aminoglycoside.

41.3. *Clostridium perfringens*

C. perfringens là loài *Clostridium* quan trọng nhất gây bệnh hoại thư sinh hơi, đây là bệnh nghiêm trọng đe dọa đến mạng sống. Vi khuẩn này cũng gây chứng viêm ruột

hoại tử và gây ngộ độc thực phẩm.

41.3.1. Đặc điểm của vi khuẩn

41.3.1.1. Hình thái

C. perfringens biểu hiện các đặc điểm hình thái sau:

(1). Là trực khuẩn Gram dương, hình dạng trong giống hình chữ nhật, có kích thước lớn dài 4 - 6 μm .

(2). Trực khuẩn ở dạng tế bào đơn, chuỗi hoặc hợp thành bó (Hình 41.3). *C. perfringens* hình thành capsule.

(3). *C. perfringens* không di động, tuy nhiên khuẩn này sinh sản rất nhanh, trên môi trường khuẩn lạc có hình dạng lan ra đặc trưng, trong giống như sự tăng trưởng của clostridia di động.

(4). Khuẩn này có vị trí nội bào tử ở cận đầu cuối của tế bào. Tuy nhiên sự hình thành bào tử của vi khuẩn hiếm khi được nhìn thấy trong các mẫu bệnh phẩm hay trong môi trường nuôi cấy.

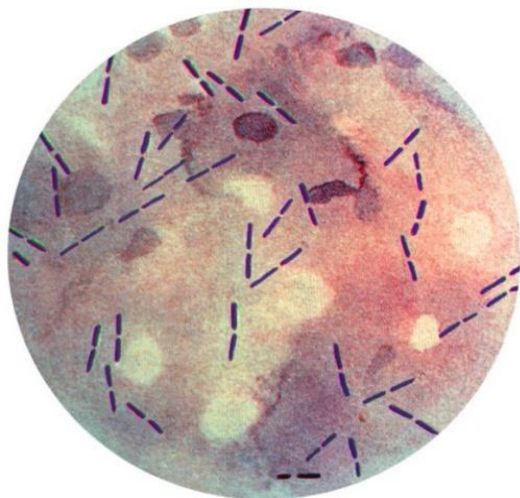
41.3.1.2. Nuôi cấy

C. perfringens là vi khuẩn kỵ khí nhưng chịu được oxygen. Khuẩn này có thể tăng trưởng trong điều kiện vi hiếu khí và không bị chết dưới áp suất không khí. Chúng tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ 20 - 44°C, tối thích ở 37°C và ở khoảng pH từ 5,5 - 8,0.

(1). Môi trường Robertson lỏng thịt luộc (RCM): *C. perfringens* tăng trưởng nhanh trong mô và trong môi trường nuôi cấy. *C. perfringens* tăng trưởng tốt trong RCM. Thịt không bị phân cắt nhưng trở nên có màu hồng. Khuẩn này tạo ra phản ứng acid và có mùi khó chịu khi nuôi cấy. Một số chủng của *C. perfringens* có thể tăng trưởng tối thích ở 45°C, thời gian thế hệ giảm xuống còn 10 phút. Đặc điểm này dùng trong phân lập *C. perfringens* ở môi trường RCM, khi mẫu thử bị nhiễm các loài clostridia khác. Cấy các mẫu này vào RCM, ủ ở 45°C trong 4 - 6 phút và sau đó cấy trên môi trường thạch máu để làm thuần và chọn các khuẩn lạc ưu thế của *C. perfringens*.

(2). Môi trường thạch máu: trên môi trường thạch máu có chứa máu người, cừu hay thỏ, khi ủ kéo dài *C. perfringens* sản sinh ra vòng tiêu huyết đôi. Vòng tiêu huyết hẹp là vòng tiêu huyết hoàn toàn do độc tố theta tạo ra và vòng rộng hơn là vòng tiêu huyết

không hoàn toàn do độc tố alpha của vi khuẩn tạo ra.



Hình 41.3. Ảnh nhuộm Gram mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân bị bệnh hoại thư sinh hơi có vi khuẩn Gram dương *C. perfringens* (CDC). *C. perfringens* là vi khuẩn được tìm thấy trong nhiều nguồn môi trường và trong đường ruột người và động vật. *C. perfringens* thường phát hiện được trong thịt và thịt gia cầm nguyên liệu. Khuẩn này sống trong đất và cũng được tìm thấy trong vết thương bị nhiễm đất có *C.*

***perfringens* dẫn đến gây bệnh hoại thư sinh hơi.**

41.3.1.3. Phản ứng sinh hoá

C. perfringens biểu hiện các phản ứng sinh hoá sau đặc trưng sau:

(1). *C. perfringens* lên men được glucose, lactose, sucrose và maltose, sản sinh ra acid và hơi;

(2) Khuẩn này tạo H_2S và khử nitrate thành nitrite;

(3). Chúng có phản ứng MR dương, VP âm và indole âm. *C. perfringens* lên men lactose tạo acid trong sữa quỳ. Màu sắc của môi trường thay đổi từ màu xanh da trời đến màu đỏ. Casein của sữa bị đông tụ do sự hình thành acid và sữa ngưng tụ sẽ bị rã ra do một lượng lớn khí hình thành. Do sự phóng thích của khí nên nắp paraffin bị đẩy ra cùng với các mảnh nhỏ sữa đông tụ do bị bẻ gãy dính trên mặt ống nghiệm thủy tinh. Phản ứng này được gọi là sự lên men mảnh liệt của *C. perfringens*.

Các đặc điểm khác

41.3.1.4. Các yếu tố khác

Bào tử *C. perfringens* bị tiêu diệt ở nhiệt độ sôi trong 5 phút, nhưng bào tử của một số chủng gây ngộ độc thực phẩm như type A, một số chủng type C thì thời gian bị tiêu diệt ở nhiệt độ sôi kéo dài hơn 1 - 3 giờ. Bào tử *C. perfringens* cũng bị tiêu diệt ở chế độ hấp thanh trùng $121^\circ C$ trong 15 phút. Bào tử *C. perfringens* có khả năng kháng phổ biến các chất khử trùng. Trục khuẩn này nhạy cảm với metronidazole và penicillin.

C. perfringens có khả năng chịu được thế nước (a_w) thấp nhất là 0,93, trong khoảng pH từ 5 - 9, nhiệt độ từ 10 - 52°C và có khả năng chịu được dung dịch NaCl 7%. Trong sản phẩm thực phẩm thủy sản, *C. perfringens* có khả năng phát triển và hình thành độc tố nếu như sản phẩm được bảo quản vượt quá các giá trị nhiệt độ và thời gian sau: ở 10-12°C trong 21 ngày, 13-14 °C trong 1 ngày, 15-21°C 6 giờ, 21°C 2 giờ.

41.3.1.4. Phân kiểu (typing)

Dựa trên bốn độc tố chính đó là độc tố alpha, độc tố beta, độc tố epsilon và độc tố iota do *C. perfringens* tạo ra, các chủng *C. perfringens* được phân thành năm kiểu A, B, C, D và E. Phân nhóm các chủng được tiến hành trong thử nghiệm trong cơ thể sống (*in vivo*) trên động vật. Thử nghiệm này được tiến hành nhờ sự trung hòa các độc tố với kháng độc tố đặc hiệu được tiêm qua đường tĩnh mạch hay tiêm vào dưới da chuột.

41.3.2. Đặc điểm gây bệnh

41.3.2.1. Yếu tố gây bệnh

C. perfringens tạo ra hơn 12 độc tố và enzyme. Tất cả là yếu tố gây độc, góp phần cho sự phát sinh bệnh (Bảng 41.2).

41.3.2.2. Độc tố

(1). Các độc tố chính gồm: (a) alpha, (b) beta, (c) epsilon và (d) iota là bốn độc tố chính do *C. perfringens* tạo ra.

Độc tố alpha: đây là độc tố quan trọng nhất do tất cả các chủng *C. perfringens* tạo ra. Trong số độc tố alpha do *C. perfringens* tạo ra, alpha type A chiếm tỷ lệ lớn nhất. Độc tố alpha chính là lecithinase, phospholipase C có sự hiện diện của ion calcium và magnesium, có chức năng bẻ gãy lecithin thành phosphoryl choline và diglyceride. Độc tố này gây nhiễm độc huyết thường quan sát được trong quá trình hoại thư sinh hơi. Chúng là độc tố gây chết, gây hoại tử da và tiêu huyết. Độc tố alpha làm tăng tính thấm của các mạch máu, dẫn đến gây ra sự tiêu huyết khối và rỉ máu, phá hủy mô và tạo ra sự thay đổi khác lạ của mô cơ (myocardial dysfunction). Độc tố này phân hủy hồng cầu, bạch cầu leukocyte, tiểu cầu và tế bào nội mô. Độc tố alpha gây tiêu huyết tế bào máu đỏ của hầu hết các loài động vật ngoại trừ dê và ngựa. Độc tố này tương đối bền nhiệt và bị bất hoạt từng phần ở nhiệt độ sôi trong 5 phút. Sự phân giải của các tế bào máu đỏ quan

sát được tốt nhất khi ủ ở 37°C sau đó ủ lại ở 4°C, quá trình này gọi là sự phân giải nóng - lạnh.

Các độc tố chủ yếu khác: gồm độc tố beta, epsilon và iota là những độc tố chủ yếu khác bên cạnh độc tố alpha; những độc tố này cũng có vai trò chính trong phát sinh bệnh. (i). Độc tố beta gây bệnh hoại tử trong chứng viêm ruột hoại tử. (ii). Độc tố epsilon là tiền độc tố (protoxin), chất này cần trypsin hoạt hóa. Độc tố này làm tăng tính thấm mạch của thành dạ dày ruột. (iii). Độc tố iota là độc tố gây chết, gây bệnh hoại tử và làm tăng tính thấm mạch.

Bảng 41.2. Các yếu tố gây độc của *Clostridium perfringens*.

Yếu tố gây độc	Chức năng sinh học
Độc tố Alpha (α)	Là độc tố gây chết, gây hoại tử da, tiêu huyết, là enzyme lecithinase; gây nhiễm độc huyết, tăng tính thấm của thành mạch máu, gây phá huỷ cơ. Nguyên nhân chính gây nhiễm độc huyết liên quan đến chứng hoại thư sinh hơi
Độc tố Beta (β)	Là độc tố gây chết; gây bệnh hoại tử trong chứng viêm ruột hoại tử
Độc tố Epsilon (ϵ)	Tiền độc tố gây chết; làm gia tăng tính thấm của thành mạch máu thuộc tuyến dạ dày ruột
Độc tố Iota (ι)	Là độc tố gây chết; gây bệnh hoại tử và làm tăng tính thấm của thành mạch máu
Độc tố Delta (δ)	Gây tiêu huyết
Độc tố Theta (θ)	Là độc tố gây tiêu huyết, nhạy cảm với oxygen và độc tố làm tan tế bào
Độc tố Kappa (κ)	Collagenase
Độc tố Lambda (λ)	Proteinase và gelatinase
Độc tố Mu (μ)	Hyaluronidase
Độc tố Nu (ν)	Deoxyribonuclease
Độc tố đường ruột	Gây độc đường ruột và làm tiêu huyết; làm thay đổi tính thấm của màng tuyến dạ dày ruột

Neuraminidase	Làm thay đổi thụ thể ganglioside của bề mặt tế bào và thúc đẩy tính thấm mao quản
Bursting factor	Gây bệnh hoại thư sinh hơi điển hình ở cơ
Yếu tố lưu thông	Làm gia tăng tính nhạy cảm adrenaline của màng mao quản
Hyaluronidase	Phá vỡ chất liên kết nội bào và thúc đẩy sự xâm nhiễm lan ra dọc theo bề mặt mô

(2). Độc tố thứ yếu khác: gồm các độc tố delta, theta, kappa, lambda, mu và nu:

- (a). Độc tố delta gây chết và làm tiêu huyết cừu, dê, gia súc... kể cả tế bào máu đỏ.
- (b). Độc tố theta là một yếu tố tiêu huyết (hemolysin) nhạy cảm với oxygen và là độc tố làm tan tế bào.
- (c). Độc tố kappa thực chất là enzyme collagenase.
- (d). Độc tố lambda là enzyme proteinase và gelatinase.
- (d). Độc tố mu là enzyme hyaluronidase.
- (e). Độc tố nu là deoxyribonuclease.

(3). Độc tố đường ruột: chủ yếu do chủng type A của *C. perfringens* tạo ra. Đây là một protein không bền nhiệt. Độc tố này được sản sinh ra trong giai đoạn hình thành bào tử của tế bào dinh dưỡng, sự hình thành độc tố đường ruột bị kích thích do môi trường kiềm trong ruột non. Độc tố này liên kết một cách chuyên biệt với thụ thể có trong biểu bì ruột non. Sự kết nối này làm phá vỡ sự vận chuyển ion trong hồi tràng (ileum) và hỗng tràng (jejunum), làm thay đổi tính thấm của màng. Độc tố đường ruột có tính kháng nguyên, nhưng kháng thể chuyên biệt chống lại độc tố này được tìm thấy có trong huyết thanh thì không được bảo vệ.

41.3.2.3. Enzyme và các chất hoà tan có hoạt tính sinh học

C. perfringens sản sinh ra nhiều enzyme và nhiều chất hoà tan có hoạt tính sinh học. Trong đó neuraminidase là enzyme quan trọng nhất, enzyme này làm thay đổi thụ thể ganglioside trên bề mặt tế bào và thúc đẩy tính thấm mao quản. Các chất hoà tan khác do *C. perfringens* sinh ra gồm fibrinolysin là yếu tố bùng phát (bursting factor), histamine, là yếu tố lưu thông. Yếu tố bùng phát hoạt động một cách chuyên biệt trên mô cơ và gây ra bệnh cơ điển hình quan sát được trong chứng hoại thư sinh hơi. Yếu tố lưu

thông làm gia tăng tính nhạy cảm adrenaline của màng mao quản và cũng ức chế sự thực bào.

41.3.2.4. Phát sinh bệnh của chứng hoại thư sinh hơi

Sự hiện diện của các loài *Clostridium* trong vết thương không gây ra chứng hoại thư sinh hơi. Diễn biến của bệnh sau khi vết thương bị nhiễm trùng phụ thuộc vào (a) sự nhân lên của tế bào clostridia và (b) theo sau là xâm lấn vào mô. Bệnh có thể tiến triển qua các bước sau:

(1). Vết thương nhiễm trùng đơn giản: bệnh này không có sự xâm lấn mô dưới hay sinh độc tố. Vì vậy chỉ làm chậm quá trình lành vết thương.

(2). Viêm mô tế bào: trong bệnh này, clostridia xâm lấn vào bề mặt và gây ra viêm mô tế bào kỵ khí, cùng với sự hình thành hơi trong các mô mềm. Vi khuẩn sinh ra độc tố tối thiểu và không xâm lấn vào mô cơ.

(3). Hoại thư sinh hơi hay hoại tử cơ do *Clostridium*: hoại thư sinh hơi là bệnh đe dọa mạng sống do hoại tử cơ, phù, lây lan nhanh do *C. perfringens* tạo ra. Bệnh xuất hiện có liên quan đến việc mô bị chấn thương nhiễm *C. perfringens* hoặc các clostridia gây bệnh khác. Chứng hoại thư sinh hơi hiếm khi do một loài *Clostridium* gây ra mà thường do nhiều loài *Clostridium* (Bảng 1). Bệnh hoại thư sinh hơi thường có liên quan với các streptococcus kỵ khí và vi khuẩn kỵ khí tùy nghi như staphylococcus, *Escherichia coli* và *Proteus*. *C. perfringens* (chủ yếu là type A) là loài phổ biến nhất gây ra chứng hoại thư sinh hơi này. Bệnh hoại thư sinh hơi xảy ra là do vi khuẩn *C. perfringens* type A cấy vào mô trong quá trình chấn thương hay phẫu thuật, sau đó vi khuẩn sao chép và xâm lấn vào mô. Các yếu tố góp phần cho sự nhân lên của vi khuẩn *C. perfringens* và các vi khuẩn kỵ khí khác tại vị trí vết thương như sau:

(a). Tình trạng oxygen thấp là điều kiện quan trọng nhất, thường gặp nhất ở các vết thương chiến tranh có viên đạn hay mảnh vỏ đạn bị cấy vào cùng với đó là đất và mảnh quần áo.

(b). Các động mạch bị rách và mô bị trầy xước làm giảm oxygen trong cơ. Sự tràn rỉ của mạch máu làm giảm lượng máu cung cấp dẫn đến mô bị thiếu oxygen hơn nữa. Điều này góp phần làm giảm tình trạng oxygen và pH của các mô bị tổn thương. Phá vỡ

carbohydrate và giải phóng amino acid từ các protein trong các cơ bị tổn thương và thiếu oxy cũng như cung cấp điều kiện phù hợp để vi khuẩn kỵ khí nhân lên. Clostridia nhân lên một số lượng lớn tế bào và sau đó sản sinh ra một lượng lớn độc tố làm tổn thương mô hơn nữa.

Một số lượng lớn độc tố và enzyme do *C. perfringens* tạo ra góp phần làm cho mô bị tổn thương hơn: (a). Enzyme lecithinase làm tăng tính thấm của các mao quản, làm cho máu tràn ra và làm tăng sự tổn thương mô cơ, gây ra tình trạng thiếu oxy hơn nữa. (b). Việc sản sinh một lượng lớn hơi (khí) do vi khuẩn sẽ làm giảm hơn nữa sự cung cấp máu và gây ra tình trạng thiếu oxy. (c). Độc tố alpha phân giải hồng cầu và gây ra sự thiếu máu do tiêu huyết và hemoglobin niệu và (d). Collagenase phá hủy nền mô và hyaluronidase phá hủy các chất nội bào nhờ đó tạo thuận lợi hơn cho sự xâm lấn và lan ra của vi khuẩn trong mô.

41.3.3. Hội chứng lâm sàng

C. perfringens gây ra nhiều hoại chứng lâm sàng như sau: (a) nhiễm trùng mô mềm, (b) viêm ruột hoại tử, (c) nhiễm trùng máu và (d) ngộ độc thực phẩm.

(a). Nhiễm trùng mô mềm do *C. perfringens* gây ra các triệu chứng có thể là (i) viêm mô tế bào, (ii) viêm cân mạc (fasciitis) và viêm cơ mưng mủ và (iii) hoại tử cơ do clostridia hay hoại thư sinh hơi.

(i). Viêm mô tế bào: clostridia có thể xâm lấn bề mặt cân mạc và gây viêm mô tế bào kỵ khí, hình thành khí trong mô mềm. Vi khuẩn sản sinh ra độc tố tối thiểu và không xâm lấn vào mô cơ.

(ii). Viêm cân mạc và viêm cơ mưng mủ: viêm cân mạc tiến triển thành viêm cơ mưng mủ, chứng bệnh này có liên quan đến việc thu thập mủ xanh trong bề mặt. Trong chứng bệnh này không có hoại tử cơ và nhiễm trùng toàn thân.

(iii). Hoại thư sinh hơi: hoại thư sinh hơi hay hoại tử cơ do clostridia là trường hợp bệnh nghiêm trọng và đe dọa mạng sống. Thời gian ủ bệnh thì dao động. Thời gian này có thể là ngắn trong 7 ngày hoặc có thể kéo dài trong 6 tuần sau khi clostridia được đưa vào mô do chấn thương hay do phẫu thuật. Bệnh tấn công nhanh và làm gia tăng cảm nhận đau, nhạy cảm và phù phần bị ảnh hưởng và có những dấu hiệu toàn thân do máu bị

nhiễm độc tố.

Sự tích tụ hơi trong mô là do hoạt động biến dưỡng phân đôi nhanh chóng của vi khuẩn, đây là đặc trưng của bệnh nên có tên là hoại thư sinh hơi. Việc sản sinh và tích tụ hơi làm cho mô răng rắc (crepitant). Đó là sự chảy ra nước loãng từ vết thương và tiếp theo là tiết ra huyết thanh máu. Ở các trường hợp không được điều trị, bệnh tiến triển rất nhanh, hoại tử cơ lan rộng, xuất hiện triệu chứng sốc, suy thận và thậm chí là tử vong trong vòng 48 giờ khi bệnh tấn công. Độc tố clostridia thường gây tiêu huyết diện rộng và gây xuất huyết và cuối cùng là gây chết do tuần hoàn thất bại.

(b). Viêm ruột hoại tử: viêm ruột hoại tử do *C. perfringens* type C là trường hợp hoại tử cấp tính của hồng tràng. Bệnh có đặc điểm như đau bụng quặn quai, tiêu chảy ra máu, sốc và viêm phúc mạc. Bệnh này nghiêm trọng và thường gây chết. Tiêm chủng với biến độc tính type C có khả năng chống lại được bệnh này. Chứng viêm ruột hoại tử còn được gọi là bệnh “Pigbel” ở Papua New Guinea. Các trường hợp bệnh xuất hiện lẻ tẻ cũng phát hiện ở Đông Phi, Thái Lan và Nepal.

(c). Nhiễm trùng máu: đây là trường hợp đe dọa mạng sống, phát hiện vi khuẩn có trong máu.

(d). Ngộ độc thực phẩm: ngộ độc thực phẩm do một số chủng của *C. perfringens* type A. Các chủng này tạo bào tử kháng được nhiệt độ. Chúng tạo ra độc tố đường ruột điển hình nhưng độc tố alpha và theta được tạo ra rất ít. Ngộ độc thực phẩm do tiêu thụ phải thịt có một lượng lớn vi khuẩn từ 10^8 - 10^9 tế bào *C. perfringens* chủng A. Thời gian ủ bệnh ngắn giữa 8 - 15 giờ sau khi sử dụng thực phẩm bị nhiễm khuẩn. Các triệu chứng gồm đau bụng dữ dội và tiêu chảy ra nước nhưng không có buồn nôn, nôn mửa hay sốt là những đặc điểm của bệnh là do độc tố đường ruột protein được sản sinh ra trong quá trình hình thành bào tử của vi khuẩn trong đường ruột. Độc tố đường ruột này (enterotoxin) có thể được phát hiện trong các chủng nuôi cấy tạo bào tử. Khả năng các chủng *C. perfringens* tạo độc tố đường ruột và khả năng gây ngộ độc thực phẩm có sự tương quan cao. Tuy nhiên gặp khó khăn trong thu nhận bào tử của một số chủng *C. perfringens* type A gây ra. Bệnh tự giới hạn và phục hồi trong vòng 24 - 48 giờ.

Ngộ độc thực phẩm do *Clostridium perfringens* có thể xảy ra khi thực phẩm như

thịt, thịt gia cầm không được nấu chín đủ hoặc không được bảo quản lạnh trước khi sử dụng. Sự hiện diện một số lượng nhỏ *C. perfringens* không thường thấy trong thịt nguyên liệu, thịt gia cầm, súp và nước xốt dạng khô, rau nguyên liệu và gia vị. Do bảo tử của một số chủng kháng được nhiệt độ cao ở 100°C trong hơn 1 giờ, nên sự hiện diện của chúng trong thực phẩm thì có thể không tránh khỏi. Hơn nữa, mức oxygen có thể bị giảm đáng kể trong quá trình nấu cho phép clostridia tăng trưởng. Bào tử sống sót sau quá trình nấu có thể nảy mầm và tăng trưởng nhanh chóng trong thực phẩm không được bảo quản đủ lạnh sau khi nấu. Do đó bằng chứng về lâm sàng và dịch tễ học cho rằng *C. perfringens* là nguyên nhân gây bùng nổ ngộ độc thực phẩm, sự hiện diện của hàng trăm, hàng ngàn hoặc nhiều hơn nữa khuẩn này/gram thực phẩm minh chứng cho nhận định đó.

Tế bào *C. perfringens* mất khả năng sống khi thực phẩm bảo quản đông hoặc được giữ lâu ở điều kiện lạnh ngoại trừ thực hiện các phòng ngừa. Việc tế bào sống của vi khuẩn mất đi sẽ gây khó khăn trong việc xác định *C. perfringens* là nguyên nhân cụ thể gây ngộ độc thực phẩm. Vì vậy có khuyến cáo cho rằng, không nên tiến hành xét nghiệm mẫu ngay tức thì mà cần xử lý với dung dịch đệm muối có glycerin sau đó bảo quản hoặc chuyển về phòng thí nghiệm trong điều kiện đông.

41.3.4. Dịch tễ học

41.3.4.1. Phân bố về địa lý

C. perfringens phân bố khắp nơi trên thế giới. *C. perfringens* type A là vi khuẩn gây bệnh phổ biến nhất ở người bao gồm cả ngộ độc thực phẩm, nhiễm trùng mô mềm, hoại thư sinh hơi và nhiễm trùng sơ cấp (primary septicemia). *C. perfringens* type C cũng là chủng vi khuẩn gây viêm ruột hoại tử.

41.3.4.2. Môi trường sống

C. perfringens type A là thành phần của hệ vi khuẩn bình thường trong tuyến tiêu hóa ở người và động vật. Vi khuẩn này được tiết vào phân và vì vậy nhiễm vào da vùng bẹn, mông và đùi. Bào tử *C. perfringens* type A thì phong phú. Chúng được tìm thấy trong đất, bụi và không khí. Các bào tử này lưu giữ sự sống của tế bào trong thời gian rất dài và ngay cả khi điều kiện môi trường bị đảo ngược. *C. perfringens* type B, C, D và F

tập kết trong đường ruột động vật và đôi khi có cả ở người. Bào tử của các chủng vi khuẩn này không tồn tại trong đất.

41.3.4.3. Nguồn và sự lan truyền bệnh

Chứng hoại thư sinh hơi xuất hiện sau khi bị tai nạn hay khi bị bất kỳ tổn thương nào liên quan đến chấn thương có trầy xước bị nhiễm một lượng lớn clostridia gây bệnh. Bệnh này hiếm khi xảy ra do phẫu thuật. Bệnh là do: (a). Vết thương bị nhiễm đất như đất có phân ủ hay đất trồng trọt, bụi đường hay mảnh vải bị nhiễm *C. perfringens* và các clostridia gây bệnh khác, đây được gọi là sự xâm nhiễm từ bên ngoài. (b). Các loài *Clostridium* hiện diện trên da bình thường, nhất là vùng bẹn và đùi, xâm lấn qua vết thương và gây nhiễm trùng gọi là sự xâm nhiễm nội tại. (c). Ngộ độc thực phẩm xuất hiện sau khi tiêu thụ phải thịt nhiễm bào tử *C. perfringens* type A. Bào tử này nảy mầm sinh độc tố gây bệnh. Thực phẩm bị nhiễm một lượng lớn vi khuẩn là nguồn xâm nhiễm bên ngoài gây bệnh viêm ruột hoại tử. Thực phẩm có một lượng lớn bào tử *C. perfringens* và sự thiếu dinh dưỡng là những yếu tố nguy cơ đối với bệnh.

41.3.5. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

Chẩn đoán hoại thư sinh hơi và các bệnh mô mềm khác ở phòng thí nghiệm được tiến hành: (a) khẳng định qua chẩn đoán, (b) xác định loài clostridia và (c) phân biệt chứng hoại thư sinh hơi viêm cơ do streptococcus gây ra.

Điều trị phải được bắt đầu ngay khi nghi ngờ cũng như dựa vào chẩn đoán lâm sàng mà không cần chờ đợi kết quả phát hiện tại phòng thí nghiệm.

41.3.5.1. Mẫu thử

Mẫu thử cho chứng hoại thư sinh hơi gồm: (1). Mủ xanh và các chất tiết khác từ phần sâu bên trong của vết thương và từ bề mặt nơi mà nhiễm trùng xuất hiện, mẫu thử phải được thu thập bằng ống mao quản hoặc bằng kỹ thuật phết (swab). (2). Kính phết lấy từ mẫu cơ tại gờ của vị trí bị ảnh hưởng, lấy mủ và dịch tiết từ phần sâu hơn của vết thương và mô bị hoại tử. (3). Mô hoại tử và cơ.

Mẫu thực phẩm: Nếu có thể, mẫu cần bảo quản ở ~10°C, chuyển đến phòng thí nghiệm để phân tích nhanh mà không cần đông lạnh. Nếu vì lý do nào đó mẫu không được phân tích sau 8 giờ cần xử lý với dung dịch đệm muối vô trùng có glycerin và bảo

quản ngay ở nhiệt độ từ -20 đến - 30°C và chuyển về phòng thí nghiệm trong điều kiện có đá khô.

41.3.5.2. Kiểm tra bằng kính hiển vi

Nhuộm Gram để xác định *C. perfringens*. Kỹ thuật này cung cấp thông tin quan tâm về loài clostridia gây nhiễm và cũng biểu thị số lượng tương đối các loài clostridia tìm thấy trong các mẫu lâm sàng giúp:

(1). Một lượng lớn trực khuẩn Gram dương không có bào tử và không có leukocyte hiện diện trong mẫu nhuộm, có thể nhận định là bệnh nhiễm trùng do *C. perfringens*.

(2). Trực khuẩn Gram dương có kích thước lớn cùng với đó là sự hiện diện của bào tử có hình oval nằm ở vị trí gần đầu cuối của tế bào vi khuẩn, có thể là *Clostridium novyi*.

(3). Trực khuẩn đa hình có dạng hình chiếc lá hay dạng hình con thuyền cùng với đó là ăn màu không đều được cho là *Clostridium septicum*.

(4). Trực khuẩn mảnh khảnh có bào tử hình oval và nằm ở đầu cuối của tế bào được cho là *C. tetani* hay *Clostridium tetanomorphum*.

41.3.5.3. Nuôi cấy

Mẫu thử được cấy đồng thời vào hai đĩa trong đó một đĩa chứa thạch máu tươi và đĩa còn lại chứa thạch máu đã gia nhiệt. Hàm lượng thạch từ 5 - 6% để ngăn chặn hiện tượng lang ra (swarming). Một đĩa cấy và ủ trong điều kiện hiếu khí đĩa còn lại cấy và ủ trong điều kiện kỵ khí trong 24 giờ hoặc ít hơn. *C. perfringens* tăng trưởng rất nhanh, vì vậy khuẩn lạc có thể xuất hiện trên môi trường sau một vài giờ ủ.

Có thể cấy vi khuẩn vào môi trường thạch TSC có chứa dịch huyền phù egg yolk, sau đó để lên một lớp TSC, ủ ở 35°C trong 20 – 24 giờ trong điều kiện kỵ khí. Trên môi trường này khuẩn lạc *C. perfringens* có màu đen, kích thước 2 - 4 mm, có vùng trắng đục bao xung quanh là do hoạt tính của enzyme lecithinase.

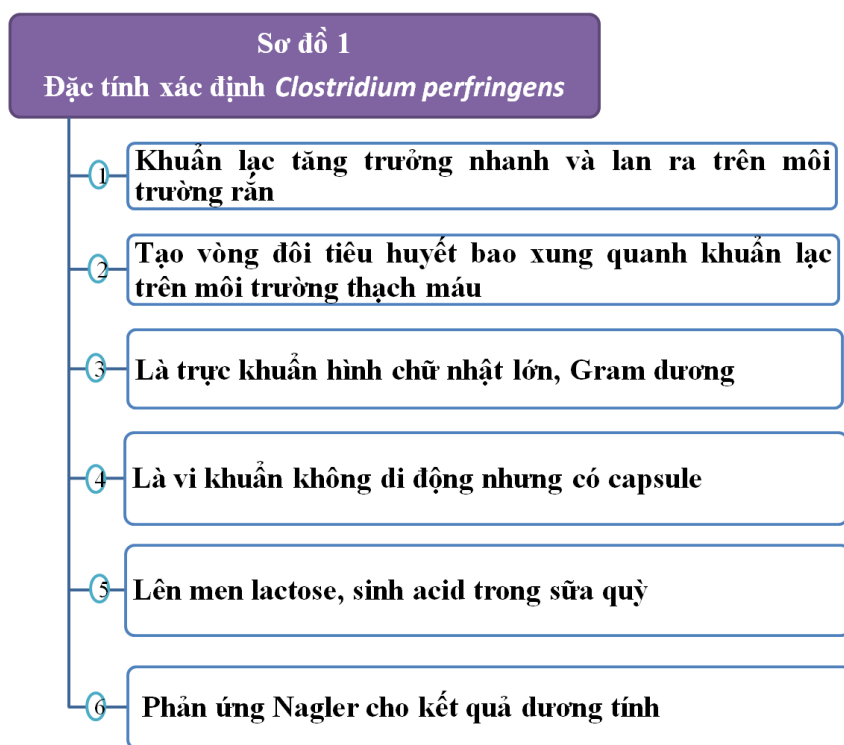
Cấy vi khuẩn vào bốn ống nghiệm có RCM, gia nhiệt lên đến 100°C trong 5, 10, 15 và 20 phút và sau đó ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ. Tiếp theo đó là phân lập trên môi trường thạch máu để phân biệt nhiều loài clostridia khác nhau. Trong nhiều trường hợp

niêm trùng, nuôi cấy máu thường cho kết quả dương tính đối với *C. perfringens* và *C. septicum*.

41.3.5.4. Định danh vi khuẩn

Đặc điểm khuẩn lạc của *C. perfringens* được xác định như sau:

- (1). Khuẩn lạc tăng trưởng nhanh và lan ra trên môi trường rắn.
- (2). Tạo vòng tiêu huyết đôi bao xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch máu.
- (3). Khi nhuộm gram vi khuẩn có dạng trực khuẩn hình chữ nhật lớn, Gram dương.
- (4). *C. perfringens* không di động nhưng có capsule.
- (5). Khuẩn này lên men lactose tạo acid trong sữa quỳ (thử nghiệm phản ứng lên men mạch cho kết quả dương).
- (6). Có phản ứng Nagler dương. Đặc điểm của *C. perfringens* được tóm tắt tại Sơ đồ 41.1.



Phản ứng Nagler:

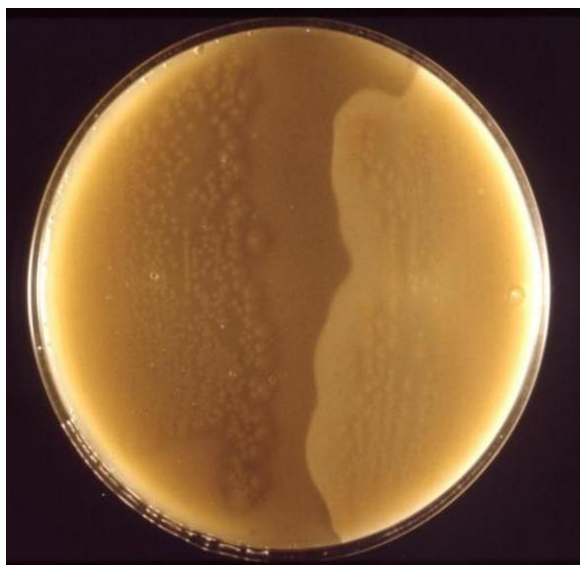
phản ứng Nagler dùng để phát hiện nhanh *C. perfringens* trong các mẫu bệnh phẩm. Phản ứng này chứng minh đặc tính sinh học của enzyme lecithinase, enzyme này tạo màu trắng đục cho huyết thanh và trong môi trường có egg yolk. Phản ứng này được trung hòa một cách chuyên biệt bằng

cách sử dụng kháng độc tố chuyên biệt.

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách nuôi cấy *C. perfringens* trên môi trường có 6% agar, 5% máu cừu đã qua xử lý và 20% huyết thanh người cùng với đó là kháng sinh

neomycin sulfate. Một nửa đĩa môi trường được cấy cùng với kháng độc tố chuyên biệt chống lại *C. perfringens*, nửa đĩa môi trường còn lại không chứa kháng độc tố. Sau 48 giờ ủ, khuẩn lạc *C. perfringens* trên phần thạch không có kháng độc tố sẽ không có biểu hiện gì về sự mờ đục (opacity). Điều này là do sự trung hòa hoạt tính enzyme lecithinase (Hình 41.4). Các tế bào dinh dưỡng mang bào tử và coliform bị neomycin sulfate có trong môi trường ức chế, kháng sinh làm cho môi trường trở nên có tính chọn lọc hơn cho *C. perfringens*.

C. novyi, *C. bifermentans*, một số tế bào dinh dưỡng mang bào tử cũng như một số loài *Vibrio* tạo ra enzyme lecithinase, vì vậy tạo ra sự mờ đục khi những vi khuẩn này tăng trưởng trong môi trường có egg yolk. Tuy nhiên phản ứng này không được kháng độc tố của *C. perfringens* trung hòa, nhưng lại được kháng độc tố của *C. bifermentans*



trung hoà, điều này tạo ra lecithinase có liên quan đến huyết thanh.

Chẩn đoán tại phòng thí nghiệm về ngộ độc thực phẩm được tiến hành bằng cách xác định số lượng vi khuẩn có trên 10^6 / gram phân, mẫu phân được thu thập trong vòng 24 giờ khi bệnh tấn công.

Hình 41.4. Khuẩn lạc *Clostridium perfringens* được nuôi cấy trên đĩa môi trường có 1/2 đĩa có kháng độc tố (CDC).

41.3.5.5. Chẩn đoán bằng huyết thanh

Phương pháp miễn dịch enzyme để phát hiện độc tố đường ruột có trong phân hiện đang phát triển để chẩn đoán ngộ độc thực phẩm.

41.3.6. Điều trị

Phẫu thuật và chìa khóa để phòng và điều trị bệnh hoại thư sinh hơi. Bệnh được điều trị tích cực cùng với đó là loại bỏ mô bị tổn thương và làm sạch vết thương để loại bỏ vật lạ, mô hoại tử và các cục máu. Điều trị bằng oxygen áp suất cao đem lại kết quả tốt. Metronidazole là kháng sinh được lựa chọn chỉ định.

41.3.7. Phòng ngừa và kiểm soát

Sử dụng kháng sinh và vệ sinh vết thương là yếu tố chính giúp ngăn chặn bệnh nhiễm trùng do *C. perfringens*. Vết thương phải được làm sạch và loại bỏ chất thải, có thể sử dụng penicillin để phòng bệnh. Hiện chưa có vaccine để chống lại bệnh này.

41.4. *Clostridium tetani*

C. tetani là trực khuẩn kỵ khí bắt buộc Gram dương, gây bệnh uốn ván. Uốn ván là bệnh rối loạn do nhiễm khuẩn, đặc trưng do sự gia tăng trương lực cơ (muscle tone) và sự co thắt do phóng thích của độc tố thần kinh có tên gọi là tetanospasmin, *C. tetani* tạo ra độc tố này khi chúng xâm nhập vào người.

41.4.1. Đặc điểm của vi khuẩn

41.4.1.1. Hình thái

C. tetani biểu hiện các đặc điểm sau:

(1). *C. tetani* là trực khuẩn Gram dương, dài từ 4 - 8 μm . Các chủng nuôi cấy còn trẻ thường có Gram dương nhưng các chủng già hơn lại có Gram dao động và thậm chí chuyển sang Gram âm.



(2). Là trực khuẩn thẳng có các mặt song song và đầu cuối tròn.

Hình 41.5. Hình ảnh nhuộm xanh methylene thấy rõ bào tử hiện diện trong nhiều tế bào vi khuẩn *Clostridium tetani* (CDC). Uốn ván là bệnh cấp tính thường gây chết do ngoại độc tố của *C. tetani*. Bệnh đặc trưng do chứng cứng lên lan rộng và co cứng cơ xương, thường liên quan đến hàm và cổ, sau đó lan rộng ra.

(3). Khuẩn này xuất hiện ở dạng đơn, đôi khi ở dạng chuỗi. Vi khuẩn có bào tử tròn phình ra ở đầu cuối tạo ra vi khuẩn có hình dạng trông giống như dùi trống (Hình 41.5). Bào tử hiếm khi được nhìn thấy ngay cả trong mẫu bệnh phẩm hay từ môi trường nuôi cấy.

(4). Tất cả các chủng *C. tetani* điều di động nhờ tiên mao ngoại trừ type VI là không di động vì không có tiên mao.

(5). *C. tetani* có capsule.

41.4.1.2. Nuôi cấy

C. tetani là vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Khuẩn này cực kỳ nhạy cảm với oxygen, nên chỉ có thể tăng trưởng trong điều kiện không có oxygen. Nhiệt độ tối thích cho sự tăng trưởng của chúng là 37°C và tại pH 7,4. *C. tetani* có thể tăng trưởng trên môi trường bình thường và trên môi trường giàu dinh dưỡng có bổ sung huyết thanh và máu.

(1). Môi trường RCM: *C. tetani* tăng trưởng tốt trên RCM. Khuẩn này tạo độ đục và sinh hơi trong môi trường. Mặc dù thịt không bị tiêu hóa nhưng sẽ bị chuyển màu đen khi nuôi ủ kéo dài.

(2). Môi trường thạch máu: trên môi trường thạch máu, *C. tetani* tạo tiêu huyết alpha bao quanh khuẩn lạc. Khi ủ kéo dài, tiêu huyết alpha sẽ trở thành tiêu huyết beta do vi khuẩn sản sinh ra yếu tố tiêu huyết tetanolysin. Bề mặt khuẩn lạc có khuynh hướng di chuyển khắp bề mặt thạch. *C. tetani* tạo ra lớp mỏng đục mờ khi tăng trưởng, điều này khó nhận biết bằng mắt thường ngoại trừ tại rìa khuẩn lạc.

(3). Cấy đâm sâu vào gelatin: *C. tetani* hóa lỏng gelatin trong điều kiện kỵ khí. Vì vậy trực khuẩn này tạo ra kiểu tăng trưởng giống như cây linh sam khi nuôi cấy đâm sâu vào gelatin trong điều kiện kỵ khí.

(4). Cấy vào thạch dinh dưỡng: cấy vi khuẩn vào phần nghiêng ống thạch có chứa môi trường dinh dưỡng, cấy từ đáy lên đỉnh của phần thạch nghiêng, sau đó ủ trong điều kiện kỵ khí trong 24 giờ để tạo ra khuẩn lạc *C. tetani* thuần. Phương pháp được gọi là kỹ thuật Fildes và được sử dụng như là phương pháp thường quy để phân lập làm thuần vi khuẩn *C. tetani*.

41.4.1.3. Phản ứng sinh hóa

C. tetani biểu hiện các phản ứng sau:

(1). *C. tetani* có hoạt tính phân giải protein nhẹ nhưng hoàn toàn thiếu khả năng phân giải đường saccharose.

(2). Khuẩn này không có khả năng lên men bất kỳ đường nào. Nó không có khả

năng sản sinh ra H_2S và không khử được nitrate.

(3). Có phản ứng indole dương nhưng MR và VP thì âm.

(4). *C. tetani* có khả năng phát huỳnh quang màu xanh nhạt trên môi trường MacConkey có chứa chất chỉ thị màu đỏ trung tính.

41.4.1.4. Các đặc tính khác

Bào tử của các chủng *C. tetani* khác nhau biểu hiện khả năng kháng nhiệt khác nhau. Hầu hết bào tử bị tiêu diệt bằng cách đun sôi ở $100^\circ C$ trong 10 - 15 phút và bằng hấp thanh trùng ở $121^\circ C$ trong 20 phút. Chúng cũng bị tiêu diệt bằng dung dịch iodine 1% và hydrogen peroxide 10%. Các bào tử này có khả năng kháng hầu hết các chất khử trùng. Chúng không bị tiêu diệt bởi các chất như phenol 5% hay dung dịch mercuric chloride 0,1%. Bào tử có thể sống sót nhiều năm trong đất.

41.4.1.5. Phân kiểu (typing)

C. tetani được chia thành 10 kiểu huyết thanh từ I đến X dựa trên sự ngưng tụ. Tất cả các chủng tạo ra độc tố giống nhau. Độc tố này được trung hòa bởi kháng độc tố chuẩn.

41.4.2. Đặc điểm gây bệnh

C. tetani là trực khuẩn không xâm lấn. Khuẩn này gây bệnh bằng cách sản sinh ra độc tố, độc tố này là những yếu tố gây độc quan trọng nhất (Bảng 41.3).

41.4.2.1. Yếu gây độc

C. tetani sản sinh ra các độc tố sau: (a) tetanospasmin, (b) tetanolysin và (c) độc tố thần kinh hay độc tố không gây co giật. Tetanolysin và tetanospasmin là hai độc tố chính, chúng có sự khác biệt về dược lý và tính kháng nguyên. Độc tố không gây co giật hay độc tố thần kinh hiện nay đã được xác định.

(a). Tetanospasmin: tetanospasmin là độc tố gây các biểu hiện lâm sàng của bệnh uốn ván. Độc tố này được tạo ra trong giai đoạn tăng trưởng ổn định của vi khuẩn nhưng độc tố chỉ được phóng thích sau khi phân giải tế bào.

(i). Tetanospasmin là một protein và được tổng hợp ở dạng chuỗi polypeptide đơn có trọng lượng phân tử 151 kDa. Khi phóng thích ra khỏi vi khuẩn, peptide này được protease nội bào chẻ thành hai chuỗi gồm một chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ (A) là

protein có trọng lượng phân tử 52 kDa và chuỗi nặng (B) là protein có trọng lượng phân tử 93 kDa; hai chuỗi này được nối với nhau bằng cầu nối disulfide.

(ii). Độc tố tinh khiết có độc lực cực kỳ lớn. Liều gây chết tối thiểu (MLD) của độc tố đối với động vật là $50 - 75 \times 10^{-6}$ mg và đối với người là 130 ng.

(iii). Loài động vật khác nhau thì nhạy cảm khác nhau với độc tố tetanospasmin. Chim và bò sát có khả năng kháng cao độc tố này. Trong khi đó ngựa là loài nhạy cảm nhất đối với độc tố này và tiếp theo sau là chuột lang, dê và thỏ theo trình tự nhạy cảm giảm dần.

(iv). Khởi đầu độc tố này liên kết với các đầu cuối của thần kinh ngoại biên. Tetanospasmin được vận chuyển trong các sợi trục thần kinh và dọc qua các khớp nối synapse cho đến khi tiếp cận được hệ thần kinh trung ương. Ở đó nó nhanh chóng được cố định vào ganglioside ở các đầu cuối dây thần kinh vận động và được hấp thụ vào sợi trục dây thần kinh nhờ sự nhập bào. Tác động của tetanospasmin là ngăn chặn sự phóng thích các chất dẫn truyền thần kinh gây ức chế như glycine và gamma-amino butyric acid dọc theo khe synapse, các chất này là cần thiết để ức chế xung thần kinh. Nếu các xung thần kinh không được kiểm tra bằng cơ chế ức chế thông thường, thì nó sẽ làm cho cơ co giật đặc trưng của bệnh uốn ván. Tetanospasmin tác động bằng cách phân cắt có chọn lọc thành phần protein của các túi synapse, synaptobrevin II và điều này giúp ngăn chặn tế bào phóng thích các chất dẫn truyền thần kinh.

(v). Ganglioside GT và /hoặc GD1b được cho là thụ thể để tetanospasmin liên kết. Liên kết xảy ra phụ thuộc vào số lượng và vị trí của các chức sialic acid trên ganglioside. Sự liên kết của độc tố là không thể đảo ngược.

(vi). Biến độc tố uốn ván có tính kháng nguyên nhưng không có độc tính. Độc tố uốn ván được điều chế thành biến độc tố bằng cách xử lý với formaldehyde.

(b). Tetanolysin: tetanolysin là một yếu tố tiêu huyết (hemolysin) không chịu được oxygen và nhiệt. Chất này có liên quan đến tính kháng kháng nguyên với các yếu tố tiêu huyết khác của clostridia và streptolysin O. Khả năng gây bệnh và vai trò của độc tố này trong phát sinh bệnh uốn ván thì chưa rõ.

(c). Độc tố thần kinh: là độc tố thứ ba được xác định. Độc tố này là một độc tố

thần kinh tác động ngoại biên và không gây co giật. Vai trò của độc tố này trong phát sinh bệnh uốn ván thì chưa được hiểu rõ.

Bảng 41.3. Yếu tố độc của *Clostridium tetani*.

Yếu tố độc	Chức năng sinh học
Tetanospasmin/Độc tố uốn ván gây co giật	Là độc tố không bền nhiệt, tác động bằng cách ngăn chặn sự phóng thích các chất dẫn truyền thần kinh gây ức chế như glycine và gamma-amino butyric acid dọc theo khe synapse. Tetanospasmin phân cắt có chọn lọc thành phần protein của các túi synapse, synaptobrevin II và giúp ngăn chặn tế bào phóng thích của các chất dẫn truyền thần kinh.
Tetanolysin/Độc tố uốn ván tiêu huyết	Là yếu tố tiêu huyết bền nhiệt, nhạy cảm với oxygen; chưa rõ tầm quan trọng về phát sinh bệnh học của nó
Độc tố thần kinh	Độc tố thần kinh ngoại biên không gây co giật, tầm quan trọng của độc tố này chưa xác định được

41.4.2.2. Phát sinh bệnh của bệnh uốn ván

Bệnh uốn ván do bào tử *C. tetani* xâm nhập vào cơ thể. Dưới điều kiện kỵ khí, bào tử nảy mầm thành tế bào dinh dưỡng và sau đó là sinh độc tố như tetanospasmin và tetanolysin, dưới những điều kiện sống kỵ khí thích hợp trong các mô bao gồm cả vết thương có thể oxy hoá khử thấp như (a) mô bị hoại tử chết, (b) yếu tố lạ trong cơ thể hay (c) xâm nhiễm.

Tetanospasmin được hấp thu cục bộ và tại hệ thần kinh ngoại biên ở tiếp hợp cơ thần kinh và được chuyển vào các neuron của hệ thần kinh trung ương.

(i). Chuỗi nặng (100 kDa) của độc tố chịu trách nhiệm cho liên kết một cách đặc hiệu đến các tế bào thần kinh và protein vận chuyển.

(ii). Chuỗi nhẹ ngăn chặn sự phóng thích hai chất dẫn truyền thần kinh chính gây ức chế là GABA và glycine, làm thất bại sự ức chế của phản ứng phản xạ vận động đối với sự kích thích cảm nhận. Điều này dẫn đến sự co thắt trên diện rộng của hệ cơ chủ vận và cơ đối vận: các đặc điểm của sự co thắt do uốn ván thì không có sự ức chế tương hỗ. Thần kinh ngoại biên ngăn nhất nhanh chóng truyền độc tố đến CNS, làm xuất hiện các

triệu chứng sớm như bị méo mặt, cứng lưng và cổ.

Độc tính của tetanospasmin phụ thuộc vào con đường xâm nhập của độc tố này. Đường vào của độc tố cũng làm thay đổi biểu hiện theo thời gian của các dấu hiệu lâm sàng.

(α). Tiêm vào thần kinh và tiêm trực tiếp vào hệ thần kinh trung ương sẽ gây chết cao nhất.

(β). Tiêm vào tĩnh mạch, cơ bắp và dưới da thì độc tố phát huy hiệu quả nhưng qua đường miệng thì không bởi vì độc tố bị enzyme trong tuyến dạ dày ruột phá hủy.

Thử nghiệm độc tố uốn ván trên động vật: thực nghiệm bệnh uốn ván ở động vật như chuột cũng phụ thuộc vào đường xâm nhập của độc tố.

Tiêm độc tố vào cơ bắp: sẽ làm cho bệnh uốn ván đi từ dưới lên. Tiêm vào cơ bắp ở một chân có liên quan đến việc xuất hiện cơ co giật do uốn ván ở chi đầu tiên được tiêm. Điều này là do độc tố tác động trên đoạn tuỷ sống. Độc tố tác động bằng cách ngăn chặn sự ức chế hay loại bỏ xung thần kinh khi chúng đi xuyên qua các tiếp hợp synapse. Dây thần kinh tiếp tục chuyển các xung dẫn đến sự co giật hay làm co cứng các cơ bị ảnh hưởng. Cứng cơ là triệu chứng sớm cùng với đó cơ hàm thường phát triển triệu chứng đầu tiên. Trường hợp này gọi là chứng khít hàm (lock jaw); cùng với đó là sự tiến triển của bệnh, co cứng phát triển ở các mô khác.

Mặc dù sự co cứng xảy ra ngắn nhưng thường gây đau đớn vô cùng và gây kiệt sức. Trường hợp này gọi là bệnh uốn ván cục bộ. Kế đến độc tố lan ra đến tuỷ sống gây bệnh uốn ván đi lên. Trong trường hợp này chân sau đối diện, thân và chân trước đều liên quan.

Tiêm độc tố vào tĩnh mạch: điều này làm cho bệnh uốn ván đi xuống. Trong trường hợp này, sự co cứng phát triển trước tiên trong các cơ đầu và cổ sau đó lan xuống, điều này trông giống như bệnh uốn ván xuất hiện một cách tự nhiên ở người.

41.3.2. Miễn dịch của cơ thể chủ

Kháng thể đặc biệt được tạo ra để chống lại độc tố uốn ván thì được bảo vệ. Các kháng thể này kết hợp một cách chuyên biệt với độc tố được phóng thích và ngăn chặn hoạt động của độc tố.

Mức độ phổ biến và sự miễn dịch bảo vệ cho trường hợp bị bệnh uốn ván ở trẻ và những người có độ tuổi từ 6 đến 39 thì lớn hơn so với người già. Người già hơn thì miễn dịch bảo vệ của cơ thể nhằm tránh khỏi bệnh uốn ván giảm. Nghiên cứu về huyết thanh ở cộng đồng cho thấy người già ở nhiều quốc gia có mức huyết thanh thấp. Khoảng 50% người già hơn 50 tuổi thì không có miễn dịch, bởi vì họ chưa bao giờ tiêm vaccine.

Bệnh uốn ván không tạo ra trạng thái miễn dịch. Vì vậy bệnh nhân sống sót khỏi bệnh cần phải tiêm chủng chủ động với biến độc tính uốn ván nhằm ngăn ngừa bệnh tái diễn.

41.3.2. Hội chứng lâm sàng

Thời gian ủ bệnh của uốn ván thì dao động trong khoảng từ vài ngày đến vài tuần, nhưng phổ biến là từ 6 - 12 ngày. Thời gian ủ bệnh phụ thuộc vào: (a) khoảng cách của vết thương nhiễm đến hệ thần kinh trung ương, (b) liều vi khuẩn cấy vào, (c) độc tính của vi khuẩn và cuối cùng là (d) trạng thái miễn dịch của cơ thể chủ. *C. tetani* gây bệnh uốn ván, bệnh có thể là các kiểu sau: (i) bệnh uốn ván lan rộng (generalized tetanus), (ii) bệnh uốn ván ở trẻ sơ sinh, (iii) bệnh uốn ván khu biệt hay cục bộ và (iv) bệnh uốn ván ở đầu.

41.3.2.1. Bệnh uốn ván lan rộng

Bệnh uốn ván lan rộng là dạng phổ biến nhất của bệnh. Bệnh xuất hiện khi độc tố được sản sinh ra tại vị trí vết thương, lan ra bạch huyết và máu đi đến nhiều đầu dây thần kinh. Điều này là bởi vì lớp màng bảo vệ máu não ngăn chặn độc tố xâm nhập trực tiếp vào hệ thần kinh trung ương. Phạm vi của chấn thương thì dao động từ tổn thương nhẹ đến tổn thương nặng. Thời gian ủ bệnh dao động từ 7 đến 21 ngày phụ thuộc vào khoảng cách của vị trí vết thương nhiễm khuẩn đến hệ thần kinh trung ương. Chứng cứng hàm (trismus) hay do liên quan đến cơ cắn (masseter muscle) là phổ biến nhất và cũng là dấu hiệu sớm của bệnh. Người bệnh cảm thấy khó nuốt, hay cáu kỉnh và cảm giác khó ngủ là những dấu hiệu sớm khác của bệnh.

Khi bệnh tiến triển, bệnh nhân sẽ bị co cứng cơ lan rộng cùng với đó là co thắt phản xạ từng cơn trong phản ứng với kích thích như ồn ào hay tiếp xúc. Chứng co cứng làm cho cơ thể người uốn cong (*opisthotonus*), bệnh có đặc điểm là gập và khép các cánh

tay, ghì chặt các nắm tay và các phần thấp hơn của cơ thể duỗi thẳng ra (Hình 41.6).

Trong suốt giai đoạn bị bệnh, trung tâm thần kinh cảm giác của bệnh nhân vẫn còn nguyên vẹn và bệnh nhân sẽ cảm nhận sự đau đớn ghê gớm. Co giật có thể gây ra sự bẻ gãy, đứt gân và suy hô hấp cấp tính. Cười do co thắt (*Risus sardonicus*) hay nụ cười bất hạnh là đặc điểm điển hình, xảy ra do các cơ tiếp tục co thắt. Bệnh có thể tiến triển trong vòng 2 tuần ngay cả khi sử dụng kháng độc tố, bởi vì cần có thời gian để chuyển kháng độc tố bên trong dây thần kinh.

Tiên lượng bệnh uốn ván phụ thuộc vào (a) thời gian ủ bệnh, (b) thời gian từ lúc bào tử được cấy vào đến triệu chứng đầu tiên xuất hiện và (c) thời gian từ lúc triệu chứng đầu tiên đến co giật uốn ván đầu tiên. Bệnh uốn ván có thời gian ủ bệnh ngắn thì trầm trọng hơn so với uốn ván có thời gian ủ bệnh dài. Khả năng phục hồi chậm hơn và thường kéo dài từ 2 - 4 tháng.



Hình 41.6. Ảnh của Sir Charles Bell, hình một chiến sỹ chết vì bệnh uốn ván. Sự co cứng đặc trưng của cơ thể chính là thể uốn cong người cùng với đó là nụ cười bất hạnh. Nguồn: Royal College of Surgeons of Edinburgh, Scotland.

41.3.2.2. Uốn ván ở trẻ sơ sinh

Uốn ván ở trẻ sơ sinh là uốn ván lan rộng, do nhiễm trùng ở trẻ sơ sinh. Bệnh xảy ra chủ yếu ở các quốc gia kém phát triển và là nguyên nhân chính gây chết ở trẻ. Bệnh

xảy ra là do sử dụng dao hay các vật khác bị nhiễm đề cắt hoặc tháo dây rốn ở trẻ nhất là ở người mẹ không có miễn dịch.

Thường ở tuần cuối của cuộc đời, trẻ sơ sinh bị nhiễm trở nên cáu kỉnh, kém ăn và phát triển co cứng cùng với đó là sự co thắt nghiêm trọng. Trường hợp này có tiên lượng bệnh rất kém để sống sót. Tỷ lệ chết vượt 70%.

41.3.2.3. Uốn ván khu biệt

Uốn ván khu biệt (localized tetanus) là một dạng khác thường của uốn ván. Bệnh này được giới hạn ở chỉ có vết thương bị nhiễm và xảy ra chỉ khi các dây thần kinh cung cấp cho cơ bị ảnh hưởng có liên quan. Bệnh này có đặc trưng do cơ cứng lên, gây ra hoạt động khác thường ở các neuron trung gian dẫn đến làm ức chế các neuron vận động alpha (alpha-motor neuron) của các cơ bị ảnh hưởng. CNS không có liên quan gì trong trường hợp này và vì vậy bệnh uốn ván khu biệt có tỷ lệ chết rất thấp.

41.3.2.4. Uốn ván ở đầu

Uốn ván ở đầu (cephalic tetanus) là một hình thức biến thể của bệnh uốn ván khu biệt. Bệnh này thường xuất hiện sau khi đầu bị tổn thương hay xảy ra khi tai giữa bị nhiễm khuẩn. Thời gian ủ bệnh thường rất ngắn dao động trong khoảng 1 - 2 ngày.

Các triệu chứng có thể cục bộ hoặc cũng có thể là toàn thân. Trường hợp này có tiên lượng bệnh kém.

41.3.3. Dịch tễ học

41.3.3.1. Phân bố về địa lý

Uốn ván là bệnh phát hiện trên khắp thế giới. Bệnh xảy ra nhiều ở các nước kém phát triển. Bệnh thường phổ biến ở những khu vực nơi đất trồng trọt, ở vùng nông thôn, ở những khu vực có khí hậu ẩm và ẩm ướt và trong những tháng mùa hè. Uốn ván ảnh hưởng đến tất cả các nhóm tuổi, mức độ phổ biến cao nhất giữa trẻ sơ sinh và người trẻ. Nhìn chung hàng năm tỷ lệ mắc phải bệnh uốn ván là từ 0,5 - 1 triệu trường hợp, hầu hết xảy ra ở các quốc gia kém phát triển. Ở các quốc gia đang phát triển, uốn ván ở trẻ sơ sinh chiếm khoảng 50% các trường hợp chết liên quan đến bệnh uốn ván.

41.3.3.2. Môi trường sống

C. tetani được phát hiện trong đất, phân động vật và đôi khi trong phân người

cũng như ở các đồ vật khác. Bào tử có thể tồn tại ở môi trường trong nhiều năm và có khả năng kháng lại chất khử trùng và thậm chí khi đun sôi trong 20 phút.

41.3.3.3. Nguồn và sự lan truyền

Bào tử *C. tetani* là hình thức xâm nhiễm của vi khuẩn. Đất, phân động vật và đôi khi phân người cũng như các đồ vật khác bị nhiễm bào tử là nguồn chủ yếu gây nhiễm.

Các yếu tố rủi ro đối với bệnh uốn ván ở trẻ gồm: người mẹ không tiêm ngừa, sinh sản tại nhà và cắt dây rốn trong điều kiện kém vệ sinh. Sử dụng phân động vật, bơ trong (clarified butter), ..., bôi lên mồm cụt của rốn (umbilical stump) là những yếu tố nguy cơ khác đối với trẻ sơ sinh. Các kiểu vết thương sau thường nhạy cảm với uốn ván hơn, đó là: (a) vết thương cực kỳ ô nhiễm; (b) vết thương phơi nhiễm với nước miếng hoặc phân; (c) vết thương hình sao, thiếu máu cục bộ (ischemic) hoặc vết thương bị nhiễm trùng; (d) vết thương sâu >1 cm cũng như (e) tổn thương do tác động nhỏ ra, chọc thủng hoặc cào xước.

41.3.4. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

Tại phòng thí nghiệm, phát hiện bệnh uốn ván giống như bệnh do *C. perfringens* được dựa trên miêu tả về lâm sàng. Phát hiện tại phòng thí nghiệm chỉ được tiến hành trên bệnh nhân để khẳng định chẩn đoán lâm sàng.

41.3.4.1. Mẫu vật

Mẫu gồm các mảnh mô xén ra từ phần sâu bị hoại tử của vết thương. Không sử dụng mẫu phết (swab) từ vết thương để phân tích.

41.3.4.2. Phát hiện dưới kính hiển vi

Nhuộm Gram kính phết *C. tetani* thường không cho kết quả như mong muốn và cũng không đủ độ tin cậy. Điều này là do khi phát hiện được trực khuẩn dạng dùi trống điển hình có trong mô bị thương thì không thể đưa ra quyết định khẳng định bệnh uốn ván là bởi vì: (a) *C. tetani* có thể hiện diện trong một số vết thương nhưng không gây uốn ván. (b) hơn nữa kính hiển vi không thể phân biệt rõ *C. tetani* với các loài *Clostridium* khác có kiểu hình tương tự như *C. tetanomorphum* và *Clostridium sphenoides* chẳng hạn.

41.3.4.3. Nuôi cấy

Mẫu được cấy trên thạch máu và ủ trong điều kiện kỵ khí trong 24 - 48 giờ. *C.*

tetani tăng trưởng thành đám (swarming growth) trải khắp mặt thạch. Vi khuẩn từ mẫu cũng được cấy vào bộ ba ống nghiệm chứa môi trường RCM, một trong ba ống này được đun nóng ở 80°C trong 15 phút, ống thứ hai trong 5 phút và ống thứ ba không đun nóng và tất cả ba ống ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ. Kế tiếp nuôi cấy chuyển (subculture) được tiến hành hàng ngày trên môi trường thạch máu trên 4 ngày. Trên môi trường thạch máu, lấy các khuẩn lạc từ vùng rìa của đám tăng trưởng để phân lập thuần *C. tetani*. Chúng dương chỉ chiếm trong 30% các trường hợp bệnh uốn ván bởi vì bệnh này chỉ được một ít vi sinh vật gây ra và nhiều vi khuẩn bị chết khi phơi nhiễm với không khí trong quá trình chuẩn bị mẫu phân tích.

41.3.4.4. Xác định vi khuẩn

Đặc điểm xác định *C. tetani* được phân biệt qua hình thái, nuôi cấy và đặc điểm sinh độc tố được tóm tắt tại Sơ đồ 41.2.

Sơ đồ 2. Đặc điểm xác định *Clostridium tetani*

- ① Tăng trưởng hình thành màng mỏng và trong mờ, hình thành đám lan ra trên toàn bộ bề mặt thạch
- ② Khuẩn lạc tiêu huyết alpha trên BA, khi nuôi ủ kéo dài sẽ thành tiêu huyết beta do sản sinh ra tetanolysin
- ③ Là trực khuẩn Gram dương có đặc điểm nổi trội là hình thành bào tử đầu cuối trong giống như đuôi trống khi nhuộm Gram kính phết khuẩn lạc
- ④ Là vi khuẩn di động (ngoại trừ type VI) và hình thành capsule
- ⑤ Không lên men các loại đường
- ⑥ Thử nghiệm hình thành độc tố trong chuột là phương pháp tin cậy để xác định chính xác khuẩn *C. tetani*

Đặc điểm xác định *Clostridium tetani*, gồm:

(1). *C. tetani* tăng trưởng hình thành màng cực kỳ mỏng và trong mờ, khuẩn này có khuynh hướng tăng trưởng thành đám lan ra trên toàn bộ bề mặt thạch môi trường.

(2). Hình thành khuẩn lạc tiêu huyết alpha trên môi trường thạch máu, khi nuôi ủ kéo dài sẽ thành tiêu huyết beta do sản sinh ra tetanolysin.

(3). Là trực khuẩn Gram dương, có đặc điểm nổi trội là hình thành bào tử ở đầu cuối tế bào vi khuẩn làm cho tế bào trong giống như đuôi trống quan sát được khi nhuộm Gram kính phết khuẩn lạc.

- (4). Là vi khuẩn di động (ngoại trừ type VI) và hình thành capsule.
- (5). Không lên men các loại đường.
- (6). Thử nghiệm hình thành độc tố trong chuột là phương pháp tin cậy để xác định chính xác khuẩn *C. tetani*.

41.3.4.5. Thử nghiệm tính sinh độc tố

Khả năng tạo độc tố của các chủng *C. tetani* được thử nghiệm như sau:

(1). Thử nghiệm trung hòa trong *In vitro* trên môi trường thạch máu: thử nghiệm này được tiến hành trên thạch máu có 4% agar. Lượng agar cao này được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng đám của *C. tetani*. Một 1/2 môi trường này được ủ với kháng độc tố uốn ván (1500 đơn vị/ mL), phần còn lại của môi trường không chứa kháng độc tố.

Các chủng *C. tetani* được cấy đâm sâu vào 1/2 đĩa môi trường và ủ trong 48 giờ. Khuẩn lạc của *C. tetani* biểu hiện sự tiêu huyết trên một phần của thạch máu không có kháng độc tố, nhưng lại không biểu hiện tiêu huyết trên phần thạch có kháng độc tố. Điều này là do sự ức chế của hoạt tính tiêu huyết của độc tố do có mặt của kháng độc tố trong thạch. Thử nghiệm này dùng để xác định khuẩn lạc *C. tetani*, nhưng không phải là thử nghiệm đáng tin cậy.

(2). Thử nghiệm trung hoà *In vivo* trong chuột: trong thử nghiệm này, lấy 0,2 mL dịch chủng *C. tetani* qua nuôi cấy ở thịt luộc trong 2 - 4 ngày để cấy vào đuôi từng con trong hai con chuột, trong đó một con được bảo vệ bằng 1000 đơn vị kháng độc tố uốn ván 1 giờ trước khi thử nghiệm, đây là vật thử nghiệm kiểm soát. Chuột còn lại không được bảo vệ bằng kháng độc tố gọi là vật thử nghiệm. Triệu chứng của uốn ván đi từ dưới lên là do tetanospasmin được *C. tetani* tạo ra phát triển trong động vật thử nghiệm sau 12 - 24 giờ sau khi cấy khuẩn. Triệu chứng bắt đầu ở chuột với chứng cứng lại của đuôi, nhanh chóng lan ra chân ở bên cấy khuẩn, đến chân đối diện, cơ thể (thân) và đến các chi trước. Chuột thường chết trong vòng 48 giờ. Ở động vật kiểm soát không có triệu chứng xuất hiện sau khi cấy khuẩn. Thử nghiệm sinh độc tố ở chuột là phương pháp tin cậy để xác định chính xác khuẩn *C. tetani*.

41.3.4.6. Huyết thanh

Thử nghiệm huyết thanh không được sử dụng bởi vì không có kháng thể đối với độc tố uốn ván (tetanus) hay không có độc tố có thể phát hiện được trong huyết thanh của bệnh nhân.

41.3.4.7. Huyết thanh học

Không nên sử dụng thử nghiệm huyết thanh học vì không thể phát hiện kháng thể đối với độc tố uốn ván hoặc độc tố uốn ván trong huyết thanh của bệnh nhân.

41.3.4.8. Các thử nghiệm khác

(1). Thử nghiệm spatula: đây là thử nghiệm thường sử dụng nhiều nhất và đơn giản bên cạnh thử nghiệm chẩn đoán bệnh uốn ván. Thử nghiệm này dựa trên việc tiếp xúc với họng hầu bằng dụng cụ spatula que đè lưỡi. Thử nghiệm này thường làm lộ ra phản xạ họng (gag reflex) và bệnh nhân cố đẩy spatula ra là thử nghiệm âm. Trong trường hợp bị uốn ván, người bệnh phát triển co thắt phản xạ cơ cắn (masseter) và cắn spatula nên cho kết quả thử nghiệm dương. Thử nghiệm này có độ đặc hiệu là 100% và độ nhạy là 94%.

41.3.5. Điều trị

Điều trị bệnh uốn ván bằng (a) liệu pháp hỗ trợ ban đầu, (b) mở ổ và chăm sóc vết thương (c) làm chấm dứt sự sản sinh độc tố, (d) trung hoà độc tố không liên kết (unbound toxin), (e) kiểm soát các biểu hiện bệnh và (f) quản lý các biến chứng. Điều trị bao gồm cả (i) liệu pháp kháng sinh và (ii) liệu pháp immunoglobulin người.

41.3.5.1. Liệu pháp kháng sinh

Kháng sinh được sử dụng để phòng ngừa *C. tetani* nhân lên trong vết thương, nhờ đó tạm dừng việc sản sinh và phóng thích độc tố. Metronidazole là kháng sinh được lựa chọn hiện nay cùng với đó là penicillin là kháng sinh lựa chọn thay thế. Tetracycline là kháng sinh lựa chọn thay thế cho những bệnh nhân bị dị ứng với penicillin hoặc metronidazole. Clindamycin, erythromycin và vancomycin cũng là các kháng sinh được sử dụng trong điều trị bệnh uốn ván.

41.3.5.2. Liệu pháp immunoglobulin người

Immunoglobulin (TIG) người bị bệnh uốn ván sẽ làm trung hoà độc tố uốn ván không liên kết (unbound tetanus toxin) và cũng ngăn chặn sự tuần hoàn của độc tố khỏi

tiếp xúc với hệ thần kinh trung ương (CNS). Liều đơn tổng thường sử dụng là 3.000 – 6.000 IU được tiêm vào cơ của người bệnh ngay sau khi có kết quả chẩn đoán. Liều thấp hơn 500 IU dùng cho trẻ sơ sinh.

Ở một số quốc gia không có sẵn TIG, kháng độc tố uốn ván ngựa (ATS) được sử dụng thay thế. Kháng độc tố uốn ván được đưa vào trong cơ ở dạng liều đơn 50.000 - 100.000 IU sau khi thử nghiệm thích hợp về độ nhạy và gây tê (desensitization) nếu cần. Liều 20.000 IU thường được đưa vào tĩnh mạch.

41.3.6. Ngăn ngừa và kiểm soát

41.3.6.1. Tiêm chủng chủ động

Bệnh uốn ván hoàn toàn được ngăn chặn nhờ tiêm chủng chủ động bằng cách sử dụng vaccin có biến độc tố uốn ván là chìa khoá ngăn chặn bệnh uốn ván. Biến độc tố trong vaccin hoặc ở dạng nguyên chất hoặc hấp phụ vào aluminum hydroxide hay phosphate. Biến độc tố này ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp với biến độc tố bạch hầu và vaccine ho gà vô bào (DTaP hay còn gọi là vaccine bộ ba kết hợp).

(1). Tiêm chủng vaccine có biến độc tố uốn ván và vaccine bộ ba kết hợp có chứa biến độc tố uốn ván thì rất an toàn và hiệu quả. Biến độc tố này sẽ kích thích làm sản sinh ra kháng thể bảo vệ, phản ứng trong gần như tất cả các đối tượng có khả năng miễn dịch. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự hiện diện của các mức kháng thể bảo vệ trong huyết thanh lên đến trên 90% người có độ tuổi từ 15 được tạo miễn dịch sau khi tiêm vaccine. Sốt và nổi đỏ hay sưng phồng tại vị trí tiêm là những triệu chứng nhẹ và cũng là những tác dụng phụ ít gặp. Chúng ta có thể không mắc phải bệnh uốn ván khi đã tiêm vaccine.

Ngăn ngừa bệnh uốn ván đạt được chủ yếu nhờ tiêm chủng bằng vaccine ba kết hợp cho trẻ có độ tuổi 2, 4, 6 và 12 - 18 tháng và trẻ từ 4 - 6 tuổi. Liều nhắc lại kết hợp giữa uốn ván - bạch hầu (dT) được sử dụng cho trẻ ở 11 - 12 tuổi và sau mỗi 10 năm.

Khi tiêm chủng ban đầu cho trẻ 7 tuổi hoặc trẻ lớn hơn chưa có miễn dịch, biến độc tố uốn ván được đưa vào hai liều cách nhau 4 - 6 tuần, liều thứ ba sau đó 6 - 12 tháng. Liều nhắc lại, sau mỗi 10 năm hay sau hơn 5 năm cần tiêm lại nếu cơ thể bị thương.

Tiêm vaccine bằng biến độc tố uốn ván được khuyến cáo cho: (a) tất cả người lớn

có hoặc không sử dụng liều nhắc lại trong 10 năm qua, (b) người lớn phục hồi khỏi bệnh uốn ván và (c) người lớn chưa bao giờ được tiêm chủng uốn ván.

(2). Tiêm chủng để phòng ngừa uốn ván ở trẻ sơ sinh: uốn ván ở trẻ sơ sinh được phòng ngừa nhờ gia tăng tiêm chủng ở phụ nữ ở độ tuổi sinh sản, nhất là phụ nữ mang thai và nhờ cải thiện chăm sóc thai sản. Đối với phụ nữ mang thai chưa có miễn dịch, biến độc tố uốn ván được tiêm hai lần trong quá trình mang thai, cách nhau 4 - 6 tuần, thích hợp nhất ở hai kỳ ba tháng (trimester) cuối và nhắc lại ít nhất 4 tuần trước khi sinh. Kháng thể kháng uốn ván của mẹ được truyền qua nhau thai và miễn dịch thụ động này hiệu quả trong nhiều tháng sau khi sinh.

(3). Tiêm chủng thụ động: TIG người được sử dụng để tạo miễn dịch thụ động. Ở một số quốc gia không có sẵn TIG, thì ATS cũng được sử dụng cho mục đích này. Tạo miễn dịch thụ động được tiến hành bằng cách đưa 250 - 500 IU TIG vào trong cơ hoặc bằng cách tiêm dưới da hoặc tiêm vào cơ 1.500 đơn vị ATS. Tạo miễn dịch thụ động được khuyến cáo cho: (a) các cá thể không có tiêm chủng và (b) cho những người mà tình trạng tiêm chủng miễn dịch không sẵn sàng khi có vết thương bị nhiễm trùng hoặc có thể có mô bị hoại tử.

(4). Tiêm chủng kết hợp: ngăn ngừa thứ cấp bệnh uốn ván đạt được sau phơi nhiễm bằng cách làm sạch và mở ổ vết thương phù hợp, cùng với đó tiêm chủng kết hợp.

41.4. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum là vi khuẩn kỵ khí, có hình que, Gram dương và hình thành bào tử ở vị trí cận đầu cuối của tế bào. Khuẩn này sản sinh ra protein có độc tính thần kinh đặc trưng. Dưới một số điều kiện, *C. botulinum* có thể tăng trưởng trong thực phẩm và sản sinh độc tố. Ngộ độc do độc tố botulinum là một dạng ngộ độc thực phẩm nghiêm trọng, là kết quả của việc tiêu thụ thực phẩm có chứa độc tố. Mặc dù bệnh dạng này thì hiếm khi xảy ra nhưng một khi xảy ra thì có tỷ lệ chết cao; theo thống kê từ năm 1899 - 1990 ở Hoa Kỳ có 962 vụ bùng nổ ngộ độc botulism, trong đó có 2.320 trường hợp liên quan và làm chết 1.036 trường hợp. Ở các vụ bùng nổ này có các kiểu độc tố của *C. botulinum* được xác định là: 384 vụ do type A, 106 do type B, 105 do type E, và 3 do type F. Trong hai vụ bùng nổ có cả độc tố type A và B. Do có rất ít báo cáo về các vụ ngộ

độc do độc tố C và D nên có ý kiến cho rằng 2 độc tố này có phải là yếu tố gây ngộ độc botulism ở người hay không. Có nghi ngờ rằng hai độc tố này không được đường ruột người hấp thu. Tuy nhiên tất cả các type thì quan trọng trong gây bệnh botulism ở động vật, ngoại trừ F và G, chưa được nghiên cứu rộng rãi.

Các kiểu kháng nguyên của *C. botulinum* được xác định bằng cách trung hòa hoàn toàn độc tố của chúng nhờ sử dụng kháng độc tố tương đồng (homologous antitoxin). Thường trung hòa chéo một độc tố cụ thể với kháng độc tố không tương đồng (heterologous antitoxin) thì sẽ không xảy ra hoặc xảy ra tối thiểu. Cho đến nay có bảy kiểu kháng nguyên được công nhận là từ type A đến type G. Các chủng vi khuẩn nuôi cấy của 5 trong 7 type này chỉ sản sinh một kiểu độc tố tương ứng với vi khuẩn được ấn định (type designation). Các type C và D phản ứng với kháng độc tố chéo với nhau là do các type vi khuẩn này sản sinh ra hơn một độc tố và ít nhất có chung một thành phần độc tố. Type C chủ yếu sản sinh độc tố C₁ cùng với một lượng ít hơn D và C₂ hoặc chỉ có C₂, và type D chủ yếu sản sinh độc tố D cùng với một lượng nhỏ hơn C₁ và C₂. Việc sản sinh ra hỗn hợp độc tố do một chủng của *C. botulinum* là điều phổ biến. Giữa type E và F có sự trung hòa qua lại tương đối, và hiện nay một chủng *C. botulinum* cho thấy sản sinh ra một hỗn hợp chủ yếu là độc tố type A với một lượng nhỏ type F.

Bên cạnh kiểu độc tố, *C. botulinum* có thể được phân biệt thành các nhóm chung dựa trên các đặc tính nuôi cấy, sinh hóa và sinh lý. Các chủng nuôi cấy sản sinh độc tố type C và D thì không có khả năng phân giải protein trên môi trường có lòng trắng trứng ngưng tụ hoặc thịt và có kiểu biến dưỡng chung với các vi khuẩn khác. Tất cả các chủng sản sinh độc tố type A và một số sản sinh độc tố B và F có khả năng phân giải protein (proteolytic). Tất cả các chủng type E và các chủng B và F còn lại thì không phân giải protein, chúng có kiểu biến dưỡng carbohydrate khác với các nhóm C và D không phân giải protein. Các chủng sinh độc tố G chưa được nghiên cứu kỹ.

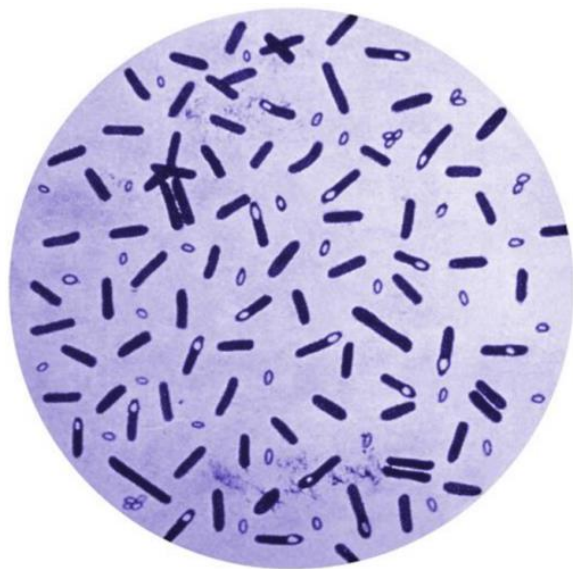
C. botulinum kiểu A, B, E và F gây bệnh cho người.

41.4.1. Đặc điểm vi khuẩn

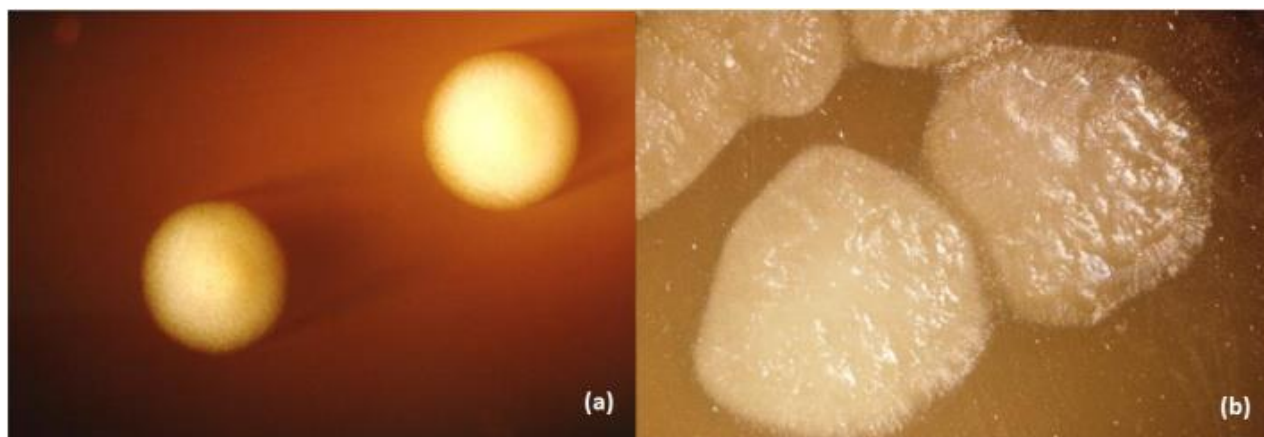
41.4.1.1. Hình thái

C. botulinum biểu hiện các đặc điểm hình thái sau: (a) là vi khuẩn Gram dương khi

chúng nuôi cấy sau 18 giờ, là Gram âm sau 18 giờ khi ủ. (b) tế bào có kích thước $5 \times 1 \mu\text{m}$. (c) di động nhờ tiên mao xung quanh và có bào tử hình oval phình ra nằm ở vị trí gần đầu cuối tế bào vi khuẩn (Hình 41.7). (d) không hình thành capsule.



Hình 41.7. Ảnh nhuộm gentian violet mẫu bệnh phẩm cho thấy nhiều vi khuẩn và bào tử *Clostridium botulinum* Gram dương (CDC). Vi khuẩn hình thành bào tử cho phép chúng tồn tại ở trạng thái ngủ đông cho đến khi tiếp cận được với các điều kiện hỗ trợ tăng trưởng. Có bảy loại độc tố botulin được ký hiệu từ A đến G nhưng chỉ có các kiểu A, B, E và F là gây bệnh cho người.



Hình 41.8. (a). Khuẩn lạc *C. botulinum* Type A trên môi trường thạch máu sau 48 giờ ủ (CDC). (b) Khuẩn lạc *C. botulinum* Type E biểu hiện vùng đục mờ trên môi trường thạch có egg yolk sau 48 giờ ủ (CDC).

41.4.1.2. Nuôi cấy

C. botulinum là vi khuẩn yêu cầu kỵ khí nghiêm ngặt. Khuẩn này tăng trưởng tối thích ở nhiệt độ 35°C . Chúng có thể tăng trưởng trên nhiều môi trường khác nhau bao gồm thạch máu, thạch Mueller–Hinton, môi trường thạch có egg yolk và môi trường RCM. Trên môi trường thạch máu, *C. botulinum* hình thành khuẩn lạc lớn, không đều và

trong mờ, có bờ không đều. Khuẩn này tạo khuẩn lạc khi tăng trưởng trong môi trường kiềm có glucose và gelatin ở 20 - 25°C.

41.4.1.3. Phản ứng sinh hoá

C. botulinum biểu hiện các phản ứng sinh hoá sau: (a) *C. botulinum* được xác định nhờ khả năng lên men glucose, thuỷ giải được gelatin, phân cắt protein và sản sinh ra enzyme lipase. (b) Sự sản sinh enzyme lipase được chứng minh nhờ sự hình thành màng ngũ sắc (iridescent film) trên khuẩn lạc của chúng khi *C. botulinum* tăng trưởng trên môi trường thạch có egg yolk.

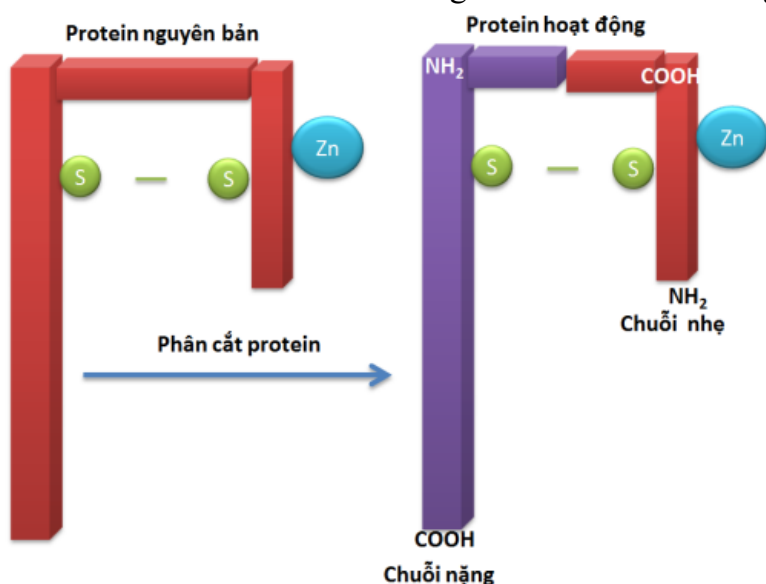
Nhiệt độ tối thích cho tăng trưởng và hình thành độc tố của các chủng phân giải protein trong khoảng 35°C; các chủng không phân giải protein là 26 - 28°C. Type B, E, và F không phân giải protein có thể tạo độc tố ở nhiệt độ mát (3 - 4°C).

41.4.1.4. Phân kiểu

C. botulinum là nhóm vi khuẩn dị hình, sinh bào tử, kỵ khí, Gram dương. Khuẩn này được phân thành bảy kiểu từ A đến G dựa trên tính chuyên biệt về kháng nguyên của các độc tố này.

41.4.1.5. Các đặc điểm khác

Vi khuẩn *C. botulinum* cũng như bào tử của chúng có khả năng kháng cao. Chúng



kháng được nhiệt độ sôi ở 100°C trong vài giờ nhưng bị tiêu diệt khi hấp áp suất ở 120°C trong 10 phút. *C. botulinum* type B, E, và bào tử F kháng nhiệt tương đối kém. Các độc tố này bị phá huỷ ở nhiệt độ sôi trong 10 phút hoặc khi nấu ở 80°C trong 30 phút.

Hình 41.9. Minh hoạ cấu trúc độc tố của vi khuẩn *C. botulinum*.

41.4.2. Đặc điểm gây bệnh

Vi khuẩn *C. botulinum* không xâm lấn. Chúng gây bệnh chủ yếu sinh ra ngoại độc tố, độc tố botulinum, là yếu tố gây độc chính của vi khuẩn (Bảng 41.4).

41.4.2.1. Yếu tố gây độc

(1). Độc tố botulinum: độc tố botulinum là một protein có trọng lượng phân tử 70 kDa. Độc tố này tương đối bền nhiệt. Nó bị bất hoạt ở 80°C trong 30 - 40 phút và ở 100°C trong 10 phút. Độc tố này có cấu trúc và chức năng tương tự như độc tố uốn ván, trừ vị trí hoạt động.

Độc tố này có một số đặc tính như sau:

(a). Độc tố botulinum khác với các ngoại độc tố khác ở chỗ nó chỉ được sản sinh ra khi nào tế bào vi khuẩn chết và tự phân giải, nhưng khi vi khuẩn còn sống độc lại không được sinh ra.

(b). Độc tố botulinum là một protein nguyên bản được tổng hợp trong nội bào vi khuẩn. Độc tố này gồm hai tiểu đơn vị A và B. Tiểu đơn vị A là chuỗi nhẹ và là độc tố thần kinh. Tiểu đơn vị B là chuỗi nặng, giúp ngăn chặn phân độc tố thần kinh (chuỗi A) tránh bị bất hoạt do acid dạ dày. Có hơn ba tiểu đơn vị B có thể hiện diện trong độc tố này.

(c). Độc tố botulinum là độc tố tự nhiên có độc lực mạnh nhất đối với con người. Liều gây chết của độc tố này trên chuột là 33^{-9} mg và đối với người là 1- 2g. Độc tố botulinum gây chết ở mức femtomole với liều là 10^{-12} g/kg, điều này cho thấy độc tố botulinum có độc lực cao gấp 15.000 - 100.000 lần so với khí serin.

(d). Độc tố này cũng có thể là biến độc tố.

Phụ thuộc vào sự khác nhau về miễn dịch ở các độc tố do *C. botulinum* tạo ra, có tám độc tố botulinum khác biệt về kháng nguyên đã được xác định gồm các type A, B, C1, C2, D, E và F, G. Những độc tố khác biệt này giống nhau về chức năng sinh học nhưng lại khác nhau ở tính miễn dịch. Các độc tố này chỉ được trung hoà một cách chuyên biệt bởi kháng huyết thanh đồng dạng của chúng.

(i). Một chủng vi khuẩn chỉ tạo một độc tố.

(ii). Trong một số trường hợp, một chủng có thể sản sinh ra nhiều hơn một độc tố. Ví dụ, type C chủ yếu sản sinh độc tố C₁ cùng với một lượng nhỏ hơn D và C₂ hoặc chỉ

có C₂, và type D chủ yếu sản sinh độc tố D cùng với một lượng nhỏ hơn C₁ và C₂. Tất cả các độc tố là chất độc thần kinh ngoại trừ C₂.

Độc tố thần kinh tác động một cách chuyên biệt lên thần kinh cholinergic. Nó tác động bằng cách ngăn chặn phóng thích chất dẫn truyền thần kinh là acetylcholine, tại các synapse và tại tiếp hợp thần kinh cơ. Độc tố này làm teo cơ tại vị trí nhiễm, nhưng các neuron tái tạo phục hồi trong vòng 2 - 4 tháng.

Bảng 41.4. Yếu tố gây độc của *Clostridium botulinum*.

Yếu tố gây độc	Chức năng sinh học
Độc tố botulinum	Tất cả là độc tố thần kinh ngoại trừ C ₂ ; độc tố thần kinh tác động một cách chuyên biệt lên thần kinh cholinergic; nó tác động bằng cách ngăn chặn sự phóng thích acetylcholine tại các synapse và tại các tiếp hợp thần kinh cơ.

41.4.2.2. Phát sinh bệnh

Bệnh do độc tố của *C. botulinum* gây ra nhiều cách:

- Do tiêu thụ thực phẩm có độc tố của *C. botulinum*.
- Bệnh ở trẻ là do độc tố *C. botulinum* hiện diện trong đường ruột.
- Bệnh ở vết thương là do *C. botulinum* nhiễm vào vết thương sinh ra độc tố.

Khi vào dạ dày và ruột non, độc tố được hấp thu do chúng không bị enzyme tiêu hoá làm biến tính. Độc tố xâm nhập vào hệ thống mạch và được chuyển đến các đầu cuối của đầu dây thần kinh cholinergic ngoại biên như tiếp hợp thần kinh cơ, đầu cuối dây thần kinh phó giao cảm cholinergic và một số hạch ngoại biên (peripheral ganglia).

Độc tố này liên kết với các vị trí thụ thể trên các đầu cuối của dây thần kinh vận động trước synapse và làm phong toả tính dẫn truyền của thần kinh cơ. Sau đó độc tố này xâm nhập vào đầu cuối dây thần kinh và làm ức chế sự phóng thích và dẫn truyền acetylcholine trong các sợi dây thần kinh cholinergic. Độc tố botulinum liên kết không đảo ngược với các neuron.

Hệ thống thần kinh, dạ dày ruột và trao đổi chất nội tiết chủ yếu bị ảnh hưởng. Bởi vì phần cuối của dây thần kinh vận động phản ứng với acetylcholine, khi nuốt vào độc tố botulinum làm xuất hiện chứng hạ huyết áp, biểu hiện chứng liệt mềm của các cơ hô hấp.

41.4.2.3. Hội chứng lâm sàng

C. botulinum gây ra các dạng bệnh như sau: (1) gây ngộ độc thực phẩm, (2) gây bệnh ở trẻ và (3) bệnh do vết thương nhiễm bào tử *C. botulinum*.

(1). Gây ngộ độc thực phẩm

Ngộ độc thực phẩm xuất hiện khi ăn phải thực phẩm có chứa độc tố do *C. botulinum* sinh ra. Mức độ nghiêm trọng của bệnh thì dao động từ nhẹ đến rất nghiêm trọng dẫn đến chết người trong 24 giờ. Thời gian ủ bệnh ngắn, dao động từ 12 đến 36 giờ sau khi tiêu thụ thức ăn bị nhiễm.

(i). Buồn nôn, nôn mửa, khô miệng, táo bón, đau bụng, mờ mắt... là các triệu chứng ban đầu. Bệnh thường không gây sốt.

(ii). Bệnh tiến triển như làm yếu từ từ xuống hai bên các cơ ngoại vi (peripheral muscle), dẫn đến liệt cơ mềm.

(iii). Sốt thường không xuất hiện.

Chết do liệt cơ hô hấp xảy ra trong khoảng thời gian từ 1 - 7 ngày sau khi bị bệnh tấn công. Tỷ lệ chết thì dao động từ 10% đến 25%. Sử dụng các phương tiện trợ giúp y khoa tích cực ở bệnh viện sẽ làm giảm tỷ lệ chết đến 20% khi được trợ giúp sớm.

(2). Bệnh do độc tố của *C. botulinum* gây ra ở trẻ

Bệnh do độc tố của *C. botulinum* gây ra ở trẻ không giống như ngộ độc thực phẩm. Ở trường hợp này vi khuẩn *C. botulinum* tập kết trong dạ dày ruột của trẻ. Các triệu chứng ban đầu thường không đặc trưng và bao gồm cả táo bón, hôn mê, cơ thể yếu đi, giọng khò khè yếu ớt và thay đổi, mất kiểm soát ở đầu, Bệnh có thể tiến triển thành liệt cơ mềm và suy hô hấp. Trẻ tiết độc tố trong phân.

Ngộ độc botulism ở trẻ từ 6 tuần đến 1 năm tuổi là một trường hợp lâm sàng khác biệt được công nhận đầu tiên vào năm 1976. Hình thức của ngộ độc botulism này là kết quả của sự tăng trưởng và tạo độc tố của *C. botulinum* trong tuyến dạ dày ruột của trẻ hơn là do tiêu thụ thực phẩm có sẵn độc tố. Trường hợp này thường do *C. botulinum* type A hoặc B, nhưng một số trường hợp do các type khác.

Táo bón thường xảy ra ở trẻ sơ sinh bị ngộ độc botulism và thường xảy ra trước dấu hiệu đặc trưng liệt cơ thần kinh cơ (neuromuscular paralysis) vài ngày hoặc vài tuần.

Mức độ nghiêm trọng của bệnh này thì dao động lớn. Một số trẻ cho thấy chỉ ốm nhẹ, hôn mê (lethargy) và biếng ăn và không đòi hỏi phải nhập viện. Nhiều trẻ cho thấy có triệu chứng nghiêm trọng hơn như bú và nuốt yếu cùng với đó khóc; cơ yếu và phản xạ họng bị giảm và có một lượng dịch tiết trong miệng. Yếu cơ và mất kiểm soát đầu ở một số trẻ biểu hiện mức độ nghiêm trọng của bệnh và bệnh nhân xuất hiện hiện tượng “mềm - floppy.” Ở một số trường hợp nhập viện, xuất hiện triệu chứng suy hô hấp nặng (respiratory arrest), nhưng hầu hết hồi sức thành công, cùng với sự chăm sóc tích cực thì cuối cùng người bệnh cũng hồi phục. Tỷ lệ chết trong trường hợp ngộ độc botulism ở dạng này thì thấp khoảng 2%. Để hồi phục cần một vài tuần chăm sóc tại bệnh viện.

(3). Bệnh do độc tố của *C. botulinum* do nhiễm trùng vết thương

Bệnh qua nhiễm trùng vết thương xảy ra sau khi vết thương nhiễm đất hoặc nước có nhiều bào tử *C. botulinum*. Thời gian ủ bệnh từ 4 - 14 ngày, trung bình là 10 ngày. Bệnh do độc tố của *C. botulism* qua nhiễm vào vết thương thì tương tự như bệnh do độc tố của *C. botulism* gây ngộ độc thực phẩm ngoại trừ thời gian ủ bệnh dài hơn và không có các triệu chứng ở dạ dày ruột. Vết thương thường lành tính mặc dù nhiễm nhiều bào tử *C. botulinum*.

41.4.3. Dịch tễ học

Bệnh do độc tố của *C. botulism* phát hiện khắp nơi trên thế giới.

41.4.3.1. Môi trường

C. botulinum thì đầy rẫy trong đất và nước khắp nơi trên thế giới. Bào tử type A hay B của *C. botulinum* có nhiều trong đất và được phát hiện khắp nơi trên thế giới.

Mật ong, là nguồn cung cấp bào tử *C. botulinum*, làm phức tạp các trường hợp ngộ độc botulism ở trẻ sơ sinh. Trong các nghiên cứu về mật ong, cho thấy có hơn 13% các mẫu thử có một lượng thấp bào tử *C. botulinum*. Vì lý do này, Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA), Trung tâm Phòng ngừa và Kiểm soát Dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC), và Viện Hàn lâm Nhi khoa Hoa Kỳ (AAP) khuyến cáo không nên cho trẻ dưới một tuổi sử dụng mật ong.

41.4.3.2. Phân bố về địa lý

(1). Các độc tố type A, B, E và hiếm hơn là type F và G của *C. botulinum* gây

bệnh cho người. Type C và D gây bệnh gia cầm và gây bệnh cho nhiều động vật có vú nhưng không phải người. Bệnh do *C. botulinum* gây ra ở trẻ thì phổ biến hơn ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn này gây ra. Ngộ độc thực phẩm do *C. botulinum* type A, B và F; rất hiếm khi là type E.

C. botulinum phổ biến rộng rãi trong đất và chất lắng ở đại dương cũng như ở hồ. Các khảo sát cho thấy type E trong môi trường thủy sinh có liên quan với ngộ độc botulism type E, điều này giúp truy vết cá và các thủy sản khác bị ô nhiễm khuẩn này. Các type A và B thường gặp nhất trong thực phẩm liên quan tới ô nhiễm đất. Ở Hoa Kỳ rau đóng hộp tại nhà thường ô nhiễm nhiều nhất là type A và B, nhưng ở Châu Âu các type này thường gây ngộ độc thực phẩm phổ biến.

(2). Bệnh do *C. botulinum* qua vết thương nhiễm rất hiếm khi xảy ra và do các chủng *C. botulinum* type A.

41.4.3.3. Nguồn và sự lan truyền bệnh

Bào tử *C. botulinum* gây ra bệnh botulism trong các trường hợp sau:

(1). Thực phẩm được bảo quản tại nhà, thịt hộp và các sản phẩm từ thịt, rau quả đóng hộp, thủy sản ướp bảo quản đã bị nhiễm độc tố trước đó là các nguồn chủ yếu gây ngộ độc thực phẩm.

(2). Mật ong và thực phẩm khác bị nhiễm bào tử *C. botulinum* là nguồn gây bệnh chính cho trẻ bị bệnh do vi khuẩn này.

(3). Đất và nước nhiễm một lượng lớn bào tử là nguồn xâm nhiễm chính cho bệnh do *C. botulinum* qua vết thương nhiễm trùng.

C. botulinum có thể xâm nhập vào nguyên liệu thực phẩm. Bào tử của *C. botulinum* rất phổ biến. Chúng được tìm thấy trong mang và ruột cá có vây (finfish), cua và nhuyễn thể. *C. botulinum* type E là dạng phổ biến nhất được phát hiện trong môi trường nước ngọt và biển. Type A và B thường được phát hiện trên đất liền nhưng đôi khi cũng có thể phát hiện trong nước. Chính vì vậy *C. botulinum* có trong nguyên liệu thủy sản nhất là trong đường ruột.

Sự lan truyền bệnh: bệnh do *C. botulinum* được truyền theo các cách sau:

(a). Bệnh do *C. botulinum* qua vết thương xảy ra là do vết thương nhiễm bào tử *C.*

botulinum. Bệnh xuất hiện ở (i) những người bị chấn thương có nhiễm đất, (ii) ở những người lạm dụng ma túy mạn tính và đưa vào đường tĩnh mạch và (iii) ở phụ nữ sau khi mổ lấy con, trường hợp này rất hiếm. Bệnh thậm chí có thể xuất hiện sau khi sử dụng kháng sinh để điều trị vết thương.

(2). Ngộ độc thực phẩm do *C. botulinum* gây ra là do ăn phải thực phẩm có độc tố thần kinh hình thành trước đó. Thậm chí khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm một lượng rất nhỏ các độc tố này cũng gây bệnh. Trong suốt 20 năm qua, độc tố A là độc tố phổ biến nhất gây bùng nổ ngộ độc thực phẩm; tiếp theo là độc tố B và E.

(a). Thực phẩm có nguy cơ gồm trái cây và rau đóng hộp tự chế hay trái cây và rau ngâm giấm tự làm; thủy sản và sản phẩm thủy sản và gia vị như nước sốt gia vị và ớt. Thực phẩm thương mại và thực phẩm tươi chế biến không đúng cách đôi khi cũng gây bùng nổ ngộ độc do *C. botulinum*.

(b). Bệnh botulism ở trẻ xảy ra sau khi tiêu thụ phải bào tử *C. botulinum* có trong thực phẩm của trẻ như mật ong chẳng hạn. Bào tử này sau đó nảy mầm thành tế bào dinh dưỡng tập kết trong đường ruột trẻ và tạo độc tố. Độc tố từ ruột được hấp thụ và gây bệnh cho trẻ.

41.4.4. Phương pháp phát hiện

Các chẩn đoán lâm sàng của bệnh botulism đòi hỏi mức độ cao về nghi ngờ về lâm sàng. Chẩn đoán được nghi ngờ ở bệnh nhân không có sốt tiến triển liệt cơ xuống, đặc biệt có những biểu hiện ở tuyến dạ dày ruột. Chẩn đoán tại phòng thí nghiệm là chứng minh sự hiện diện của *C. botulinum* hay độc tố:

(1). Chẩn đoán ngộ độc thực phẩm do *C. botulinum* được tiến hành bằng cách chứng minh *C. botulinum* trong thực phẩm qua nuôi cấy và chứng minh độc tố có trong thực phẩm hoặc phân của bệnh nhân.

(2). Chẩn đoán bệnh botulism ở trẻ sơ sinh bằng cách khẳng định qua phân lập vi khuẩn và phát hiện độc tố botulinum trong phân của trẻ.

(3). Chẩn đoán bệnh botulism qua vết thương bằng cách phân lập hoặc phát hiện độc tố botulinum trong mủ và dịch tiết của vết thương.

41.4.4.1. Mẫu thử

Phân, chất ói, hay dịch dạ dày hay mẫu thực phẩm được thu thập để phân tích bệnh botulism. Cơ từ vết thương được thu thập để phân tích yếu tố gây bệnh botulism qua vết thương.

Độc tố của các type không phân giải protein thì không biểu hiện độc tính cực đại cho đến khi chúng được trypsin hoạt hóa; độc tố của các type phân giải protein thường biểu hiện đầy đủ độc tính. Các đặc điểm này và những đặc điểm khác có thể là thông tin quan trọng trong xem xét về dịch tễ và phân tích ở phòng thí nghiệm về các vụ bùng nổ ngộ độc botulism. Để chẩn đoán lâm sàng hiệu quả về ngộ độc botulism cần xác định độc tố botulism trong máu, phân hoặc chất nôn của người bệnh. Các mẫu bệnh phẩm cần được thu thập trước khi người bệnh sử dụng kháng độc tố. Xác định thực phẩm gây ngộ độc thì quan trọng nhất nhằm ngăn chặn các trường hợp ngộ độc botulism.

41.4.4.2. Thử nghiệm dưới kính hiển vi

Nhuộm Gram từ mẫu thực phẩm hoặc các mẫu thử khác để phát hiện vi khuẩn *C. botulinum* Gram dương mang bào tử.

41.4.4.3. Chứng minh độc tố

Độc tố *C. botulinum* có thể được chứng minh có trong thực phẩm, phân và các mẫu thử khác nhờ phương pháp thử nghiệm sinh hoá trên chuột, ELISA và PCR.

Phương pháp sinh hóa trên chuột: dùng để phát hiện độc tố có hoạt tính sinh học. Phương pháp này gồm ba phần: sàng lọc độc tố, định lượng độc tố và cuối cùng là trung hòa độc tố bằng kháng độc tố đơn giá (monovalent antitoxin). Quy trình này đòi hỏi hai ngày cho mỗi bước phân tích.

Phương pháp thử nghiệm sinh hoá trên chuột là phương pháp thử nghiệm sinh hoá huyết thanh độc tố. Trong thử nghiệm này độc tố được chứng minh có trong thực phẩm hay trong phân bằng thử nghiệm trung hoà ở chuột. Trong phương pháp này, thực phẩm qua lọc trong nước muối vô trùng được cấy vào trong màng bụng của hai con chuột. Trong đó một con được sử dụng làm thử nghiệm kiểm soát, nghĩa là chuột được bảo vệ bằng kháng độc tố botulinum và con còn lại được dùng làm thử nghiệm chính thức, nghĩa là không được bảo vệ bằng kháng độc tố. Nếu chuột thử nghiệm chết nhưng chuột dùng kiểm soát vẫn còn sống thì thử nghiệm được xem là dương tính và độc tố có trong mẫu

thử. Đây là thử nghiệm rất hữu dụng để chứng minh nhanh độc tố botulinum trong thực phẩm.

Phương pháp ELISA: hiện nay, nhiều quy trình phân tích trong phòng thí nghiệm đã được phát triển để phát hiện độc tố type A, B, E, và F và vi khuẩn sinh các độc tố này. ELISA khuếch đại (amp-ELISA) và ELISA sử dụng IgG có đánh dấu (DIG-ELISA), có mức giới hạn phát hiện (LoD) khoảng 10 MLD/mL, để phát hiện các độc tố được sản sinh ra trong môi trường nuôi cấy. Các độc tố có hoạt tính và không có hoạt tính sinh học được phát hiện qua phương pháp phát hiện kháng nguyên của độc tố. Phương pháp ELISA chỉ mất một ngày để phân tích. Khi kết quả dương tính cần khẳng định lại bằng phương pháp sinh hóa trên chuột.

Kỹ thuật PCR: được sử dụng để phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* type A, B, E và F và cho kết quả sau một ngày phân tích, từ bào bào tử hoặc tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy qua đêm. Chi tiết mỗi khuếch đại được trình bày tại Bảng 41.5.

Bảng 41.5. Trình tự oligonucleotide mỗi dùng để khuếch đại PCR.

<i>C. botulinum</i>	Trình tự mỗi
Type A	F 5' -GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG -3' R 5' -AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT -3'
Type B	F 5' -GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG -3' R 5' -GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G -3'
Type E	F 5' -CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT -3' R 5' -TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC -3'
Type F	F 5' -GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT -3' R 5' -GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G -3'

Khi kết quả dương tính cần khẳng định lại bằng phương pháp sinh hóa trên chuột.

41.4.4.4. Nuôi cấy

Bệnh botulism do ngộ độc thực phẩm, có thể phân lập *C. botulinum* từ các mẫu thực phẩm và mẫu phân nghi ngờ nhiễm khuẩn này. Nuôi cấy mẫu thực phẩm trước tiên được tiến hành bằng cách đun nóng mẫu ở 80°C trong 10 phút để tiêu diệt các tế bào dinh dưỡng. Mẫu sau khi đun nóng sau đó được cấy trên môi trường RCM và ủ trong điều

kiện kỵ khí, sau đó phân lập thuần trên môi trường thạch máu. Ủ kỵ khí tạo thuận lợi có bào tử nảy mầm thành tế bào dinh dưỡng.

(1). Việc chứng minh *C. botulinum* trong phân, chất nôn hay có trong dịch dạ dày bằng nuôi cấy được tiến hành khi nào có nghi ngờ cao ngộ độc thực phẩm do *C. botulinum*, bởi vì trường hợp mang khuẩn khuẩn trong đường ruột thì hiếm. Chứng dương có tỷ lệ khoảng 60% các trường hợp. Độc tố cũng có thể chứng minh có trong thực phẩm hoặc trong phân để chẩn đoán ngộ độc thực phẩm.

(2). Chứng minh *C. botulinum* trong mủ và phát hiện botulinum trong mủ vết thương và dịch tiết dùng để xác định nhiễm trùng vết thương do botulinum.

(3). Phân lập vi khuẩn và phát hiện độc tố botulinum trong phân của trẻ để khẳng định bệnh do botulinum ở trẻ nhỏ.

41.4.4.5. Định danh vi khuẩn

Đặc điểm định danh *C. botulinum* được tóm tắt như sau:

(1). Trên môi trường thạch máu, khuẩn này hình thành khuẩn lạc lớn, không đều và bán trong suốt cùng với đó là bờ không đều.

(2). Là trực khuẩn Gram dương có bào tử ở gần đầu cuối và hình oval phình to ra so với tế bào dinh dưỡng.

(3). Là vi khuẩn di động và hình thành capsule.

(4). Lên men glucose, thủy giải gelatin và phân cắt protein.

(5). Tạo enzyme lipase.

(6). Phương pháp sinh hóa trên chuột về độc tố huyết thanh là phương pháp tin cậy để phát hiện độc tố do *C. botulinum* tạo ra.

41.4.5. Điều trị

Điều trị ngộ độc botulism liên quan (a) liệu pháp hỗ trợ ban đầu, (b) trung hòa độc tố chưa liên kết (unbound) bằng kháng độc tố chuyên biệt và (c) chấm dứt sự tạo độc tố của vi khuẩn bằng cách sử dụng kháng sinh.

41.4.5.1. Liệu pháp kháng độc tố

Huyết thanh kháng độc tố botulinum có hóa trị ba A-B-E được sử dụng để điều trị chuyên biệt ngộ độc do botulism. Các huyết thanh chứa các kháng thể chống lại *C.*

botulinum type A, B và E, chúng hoạt động bằng cách liên kết và trung hòa độc tố hiện diện trong huyết thanh. Kháng độc tố botulinum có hóa trị ba này được đưa nhanh vào bệnh nhân có biểu hiện triệu chứng nghi ngờ cao về ngộ độc thực phẩm clostridium và nhiễm trùng vết thương do clostridium. Kháng độc tố hữu dụng ngay cả khi tiêu thụ phải độc tố trước đó vài tuần, bởi vì độc tố tuần hoàn được phát hiện trong huyết thanh 4 tuần sau đó. Tuy nhiên kháng độc tố không trung hòa độc tố đã liên kết với tiếp hợp thần kinh cơ. Mặc dù kháng độc tố có thể tiến triển bệnh chậm nhưng nó lại không tác động thiết lập bệnh lý thần kinh.

41.4.5.2. Liệu pháp kháng sinh

Các kháng sinh được sử dụng để ngăn chặn sự nhân lên của *C. botulinum* trong dạ dày ruột và trong vết thương, làm ngưng quá trình tổng hợp và phóng thích độc tố. Metronidazole kết hợp với penicillin là hỗn hợp kháng sinh được lựa chọn chỉ định điều trị.

41.4.6. Ngăn chặn và kiểm soát

Ngộ độc clostridium qua đường thực phẩm được ngăn chặn tốt nhất bằng nấu chín ở áp suất có nhiệt độ cao sẽ tiêu diệt bào tử có trong trái cây và rau. Bảo quản thực phẩm ở 4°C hay trong điều kiện pH thấp sẽ ngăn chặn sự nảy mầm của bào tử thành tế bào dinh dưỡng nếu có. Lưu ý thực phẩm đóng lon tại gia đình cần tuân thủ về độ kín của mép hộp và điều kiện thanh trùng. Nhiễm trùng vết thương được ngăn chặn ngay lập tức và thông qua việc mở ổ vết thương bị nhiễm trùng. Lưu ý tránh sử dụng mật ong cho trẻ sơ sinh nhằm ngăn chặn ngộ độc clostridium do mật ong có khả năng chứa bào tử clostridium.

Lưu ý về điều kiện giới hạn để kiểm soát sự tăng trưởng của *Clostridium botulinum*: đối với nhóm phân giải protein type B và F các thông số về điều kiện môi trường để giới hạn sự tăng trưởng của chúng như sau: thế nước (a_w) thấp nhất trong pha muối là 0,935, cao nhất là 10; pH thấp nhất là 4,6, cao nhất là 9; nhiệt độ thấp nhất 10°C, cao nhất là 48°C. Nhiệt độ và thời gian để kiểm soát sự nảy mầm, tăng trưởng và hình thành độc tố của nhóm này là 10 - 21°C trong 11 giờ và trên 21°C là 2 giờ.

Đối với nhóm không phân giải protein type E, type B và F thế nước (a_w) thấp nhất trong pha muối là 0,97, cao nhất là 5; pH thấp nhất là 5, cao nhất 9; nhiệt độ thấp nhất

3,3°C, cao nhất là 45°C. Nhiệt độ và thời gian để kiểm soát sự nảy mầm, tăng trưởng và hình thành độc tố của nhóm này là 3,3 - 5°C trong 7 ngày, 6 -10°C trong 2 ngày, 11-21°C trong 11 giờ và trên 21°C trong 6 giờ.

Do bào tử hiện diện trong ruột thủy sản nên bất kỳ sản phẩm nào được bảo quản bằng ướp muối, làm khô, ngâm giấm hay lên men cũng cần phải moi ruột trong quá trình chế biến. Khi sản phẩm không được loại bỏ ruột, sự hình thành độc tố sẽ xảy ra trong quá trình chế biến, ngay cả khi có sự kiểm soát chặt về nhiệt độ. Việc loại bỏ ruột cá cần phải thực hiện cẩn thận và cần loại bỏ hoàn toàn tất cả các nội tạng trong khoang bụng mà không đâm thủng hay cắt chúng kể cả tuyến sinh dục. Nếu một phần ruột hay nội tạng còn sót lại, thì nguy cơ hình thành độc tố do *C. botulinum* vẫn còn. Cá có kích thước nhỏ, chiều dài hơn 5 inch, không moi ruột như cá cơm cá trích, để ngăn chặn hình thành độc tố trong quá trình chế biến, sản phẩm cuối ở nhiệt độ lạnh có pha nước cần có nồng độ muối 10% hay thể nước dưới 0,85 hoặc pH = 4,6 hoặc nhỏ hơn.

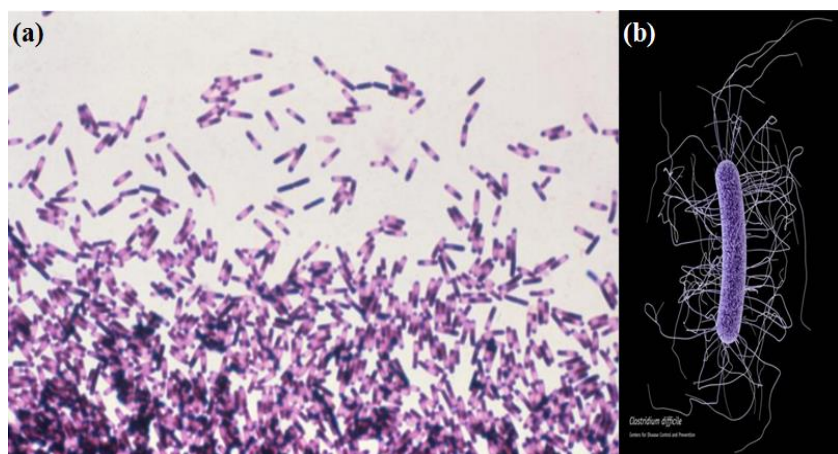
41.5. *Clostridium difficile*

41.5.1. Giới thiệu

C. difficile là vi khuẩn được mô tả đầu tiên vào năm 1935, phân lập từ phân của trẻ sơ sinh khỏe mạnh và khuẩn này không được xem là đối tượng gây bệnh. Sở dĩ khuẩn này được đặt tên là *difficile* là bởi vì chúng tăng trưởng chậm và nuôi cấy khó khăn.

41.5.2. Đặc điểm sinh học

C. difficile là trực khuẩn Gram dương, kỵ khí, có hình dạng dài mảnh khảnh, đầu



cuối có bào tử lớn, hình oval. Khuẩn này không tiêu huyết, phân giải được saccharose và phân giải protein mức độ vừa phải.

Hình 41.10. (a). Ảnh nhuộm Gram kính phết vi khuẩn *Clostridium*

***difficile* sau khi cấy trên môi trường thạch máu 72 giờ. *C. difficile* là vi khuẩn hình**

thành bào tử, khuẩn này có thể là một phần của hệ vi khuẩn bình thường trong đường ruột cũng như trong có khoảng 50% trẻ em lên hai có vi khuẩn này. *C. difficile* là nguyên nhân chính gây viêm đại tràng giả mạc và tiêu chảy liên quan đến kháng sinh.

Bào tử *C. difficile* kháng được nhiệt, nó có thể bền vững ngoài môi trường trong nhiều tháng đến nhiều năm. *C. difficile* hiện diện trong 2 - 3% cá thể trưởng thành khỏe mạnh và trong 70% trẻ sơ sinh khỏe mạnh.

41.5.3. Đặc điểm gây bệnh

Nhiễm trùng do *C. difficile* thì phổ biến nhiều ở người già; điều này có thể là do tính nhạy cảm gia tăng của hệ niêm mạc đối với sự tập kết do vi khuẩn và bệnh. Bệnh xâm nhiễm không phổ biến ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ mặc dù đây là nơi vi khuẩn và độc tố của nó thường ẩn náu.

(1). *C. difficile* là vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy và viêm ruột kết có liên quan đến kháng sinh. *C. difficile* tạo ra hai độc tố có tính kháng nguyên khác biệt đó là: độc tố A và độc tố B. Độc tố A là nội độc tố và độc tố B là độc tố tế bào.

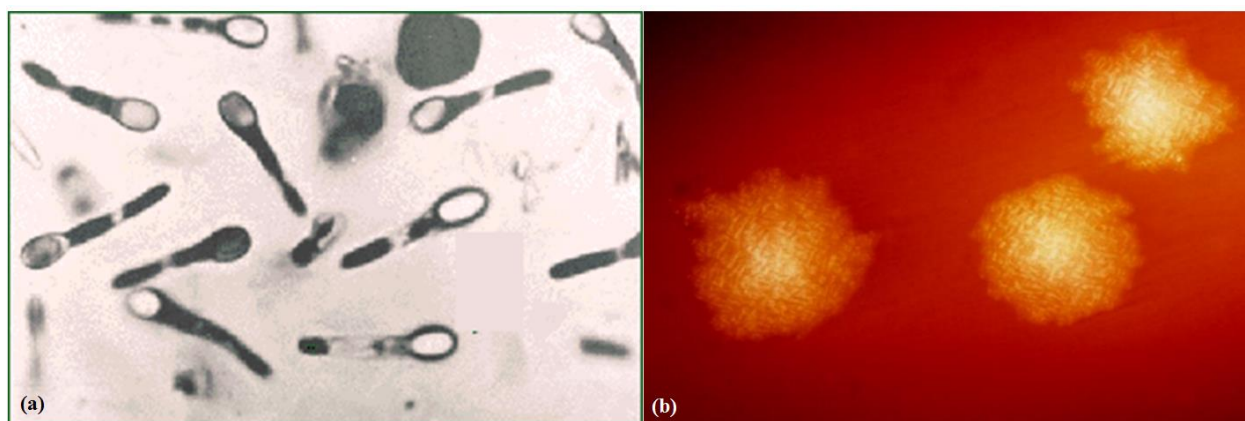
(2). Cả hai độc tố này góp phần vào việc phát sinh bệnh viêm ruột kết và tiêu chảy ở người do *C. difficile*.

(3). Cả hai protein liên kết với các thụ thể chuyên biệt hiện diện trên niêm mạc ruột. Độc tố này xâm nhập vào tế bào và xúc tác làm thay đổi chuyên biệt protein Rho và protein liên kết với glutamyl transpeptidase (GTP), điều này giúp sự polymer hóa actin, kiến trúc bộ khung tế (cytoskeletal architecture) và sự di động của tế bào. Sự tập kết *C. difficile* xảy ra do nuốt phải bào tử. Do đó sự bùng nổ bệnh tiêu chảy do *C. difficile* có thể xảy ra ở các bệnh viện nơi bị ô nhiễm bào tử phổ biến hơn.

Hệ vi khuẩn bình thường trong tuyến dạ dày ruột có khả năng kháng lại sự tập kết và tăng trưởng quá mức của *C. difficile*. Sử dụng kháng sinh là yếu tố chính làm thay đổi hệ vi khuẩn bình thường của đường ruột do kháng sinh sẽ làm ức chế hệ vi khuẩn bình thường trong đường ruột và tạo thuận lợi cho *C. difficile* tập kết và nhân lên từ đó sản sinh ra độc tố gây viêm niêm mạc cũng như làm tổn thương.

C. difficile gây khó chịu, biếng ăn và tiêu chảy từ nhẹ đến vừa, đôi khi xuất hiện

chứng đau bụng quặn. Trong hầu hết các trường hợp, người bệnh sử dụng kháng sinh dài ngày hoặc ngắn ngày, sau khi bắt đầu sử dụng kháng sinh sẽ xuất hiện triệu chứng tiêu chảy. Tuy nhiên trong 25 - 40% bệnh nhân, tiêu chảy có thể xuất hiện 10 tuần sau khi hoàn tất liệu pháp kháng sinh. Điều này liên quan đến sự hình thành màng giả và đôi khi có sự bám dính của mảng có màu sắc vàng nhạt - trắng trên niêm mạc ruột. Trường hợp này xuất hiện trong những ca hiếm cùng với đó là xuất hiện hội chứng bụng cấp (acute abdomen) và viêm ruột kết bạo phát làm đe dọa mạng sống.



Hình 41.11. (a). Nội bào tử *Clostridium difficile* (K. Todar); (b). Khuẩn lạc *Clostridium difficile* sau 48 giờ tăng trưởng trên môi trường thạch máu (CDC)

41.5.4. Phát hiện

Chẩn đoán nghi ngờ viêm ruột kết do *C. difficile* ở bệnh nhân tiêu chảy điều trị bằng kháng sinh trước đó 2 tháng và hoặc khi tiêu chảy xảy ra 3 ngày hoặc nhiều hơn sau khi nằm viện

Chẩn đoán tiêu chảy do *C. difficile* được thực hiện bằng cách chứng minh độc tố *C. difficile* có trong phân bằng thử nghiệm độc tố tế bào trong phân và bằng thử nghiệm miễn dịch dựa trên enzyme liên kết:

(a). Thử nghiệm độc tố tế bào trong phân là thử nghiệm được lựa chọn. Trong thử nghiệm này, phân tiêu chảy được lọc và sau đó ủ cấy vào dòng tế bào Hep-2 và tế bào lưỡng bội ở người để nuôi cấy. Việc chứng minh tác động làm ảnh hưởng tế bào được trung hòa bằng kháng huyết thanh chuyên biệt biểu thị cho sự hiện diện của độc tố (kết quả thử nghiệm dương). Khi không có tác động làm ảnh hưởng tế bào được xem là thử

nghiệm âm. Thử nghiệm này có độ nhạy cao 94 - 100% và có độ chuyên biệt là 99%. Sự bất tiện của thử nghiệm này chính là chi phí quá đắt và đòi hỏi phương tiện nuôi cấy mô.

(b). Hiện nay có mặt trên thị trường dùng một số phương pháp miễn dịch enzyme có độ nhạy vừa phải (69 - 87%) và có độ chuyên biệt cao (99 - 100%) để phát hiện nhanh độc tố. Thử nghiệm ngưng kết latex được áp dụng để phát hiện sự có mặt của glutamate dehydrogenase do *C. difficile* sản sinh ra dùng để phát hiện bệnh tiêu chảy do *C. difficile*. Thử nghiệm này có độ nhạy thấp (48 - 59%) nhưng có độ chuyên biệt cao (95 - 96%).

(c). Tuy nhiên nuôi cấy phân thì không phù hợp vì có sự hiện diện của các chủng *C. difficile* không sinh độc tố trong phân.

41.5.5. Điều trị

Không cần thiết phải điều trị những người mang khuẩn không biểu hiện triệu chứng bệnh. Việc ngưng sử dụng kháng sinh có thể chỉ cần thiết cho những trường hợp tiêu chảy nhẹ liên quan đến kháng sinh, không có sốt, đau bụng hay chứng tăng bạch cầu (leukocytosis). Cách tiếp cận này cho phép thiết lập lại hệ vi khuẩn bình thường ở ruột kết và làm giảm đáng kể nguy cơ tái phát.

Bệnh nhân bị tiêu chảy nghiêm trọng hoặc bị viêm ruột kết đòi hỏi phải được điều trị bằng kháng sinh. Metronidazole là thuốc được lựa chọn. Vancomycin và bacitracin là những kháng sinh cũng hiệu quả. Hơn 95% bệnh nhân cho kết quả tốt sau 10 ngày điều trị vancomycin, hoặc điều trị bằng metronidazole qua đường uống hoặc tiêm vào tĩnh mạch.